

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



<p>(51) 国際特許分類6 A61K 47/48</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/46260</p> <p>(43) 国際公開日 1997年12月11日(11.12.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/01914</p> <p>(22) 国際出願日 1997年6月5日(05.06.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/144421 1996年6月6日(06.06.96)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 第一製薬株式会社 (DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒103 東京都中央区日本橋三丁目14番10号 Tokyo, (JP) 株式会社 ディ・ディ・エス研究所 (DRUG DELIVERY SYSTEM INSTITUTE, LTD.)(JP/JP) 〒134 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 Tokyo, (JP)</p>		<p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 井上和弘(INOUE, Kazuhiro)(JP/JP) 洲崎 浩(SUSAKI, Hiroshi)(JP/JP) 池田政浩(IKEDA, Masahiro)(JP/JP) 久我 洋(KUGA, Hiroshi)(JP/JP) 熊澤栄治(KUMAZAWA, Eiji)(JP/JP) 東郷明子(TOGO, Akiko)(JP/JP) 〒134 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.) 〒103 東京都中央区八重洲一丁目8番12号 藤和八重洲一丁目ビル7階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: DRUG COMPLEXES</p> <p>(54)発明の名称 薬物複合体</p> <p>(57) Abstract Drug complexes wherein a carboxy (C<sub>1-4</sub>)alkyldextran polyalcohol, which has been treated under such conditions as to allow the substantially complete formation of the polyalcohol, is bonded to the residue of a medicinal compound such as an antitumor agent via a spacer consisting of one amino acid or a spacer consisting of two to eight amino acids bonded to each other via peptide bonds. The complexes are excellent in the tumor site selectivity and thus can exhibit a high antitumor effect with relieved expression of toxicity.</p>		

# (57) 要約

1個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した2~8個のアミノ酸からなるスペーサーを介して実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下で処理されてなるカルボキシC<sub>1-4</sub>アルキルデキストランポリアルコールと抗腫瘍剤などの医薬化合物の残基とが結合していることを特徴とする薬物複合体。腫瘍部位選択性に優れており、高い抗腫瘍作用を発揮できるとともに、毒性の発現も軽減されているという特徴を有する。

## 参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TR	トルコ
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MR	モリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	US	米国
CG	コンゴ	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NZ	ニュー・ジーランド	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PT	ポルトガル		
CU	キューバ	KR	大韓民国	RO	ルーマニア		
CZ	チェッコ共和国	KZ	カザフスタン	RU	ロシア連邦		
DE	ドイツ	LC	セントルシア	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LK	スリランカ				

## 明 細 書

## 薬物複合体

## 技術分野

本発明は医薬として有用な薬物複合体に関するものである。さらに具体的にいうと、本発明は、多糖誘導体であるカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールと抗腫瘍剤や抗炎症剤等の医薬化合物とをスペーサーを介して結合させた薬物複合体に関するものである。

## 背景技術

肺癌や消化器癌などの固形癌や白血病などの血液癌の治療に際して用いられる抗腫瘍剤は、静脈内投与や経口投与などの投与経路により全身的に投与された後、特定の腫瘍部位に移行して癌細胞の増殖を阻害ないし抑制することにより治療効果を発揮する。しかしながら、全身投与された抗腫瘍剤は、血中から肝臓・網内系臓器に速やかに取り込まれたり、あるいは速やかに尿中排泄されるために、血中濃度が低下して腫瘍部位への移行が十分でない場合がある。また、通常の抗腫瘍剤自体では腫瘍部位への移行選択性（腫瘍選択性）が低いために、抗腫瘍剤が全身の様々な細胞や組織に満遍なく分布してしまい、正常な細胞や組織に対しても細胞毒として作用するので、嘔吐、発熱、あるいは脱毛などの副作用を極めて高率に発生させるという問題がある。従って、抗腫瘍剤を効率的かつ選択的に腫瘍部位に移行させる手段の開発が求められている。

このような手段の一つとして、多糖高分子に抗腫瘍剤を結合させて、抗腫瘍剤の血中からの消失を遅延させ、かつ、癌組織への指向性を高める方法が提案されている。例えば、特公平7-84481号公報には、カルボキシメチル化されたマンノグルカン誘導体に Schiff 塩基や酸アミド結合を介してダウノルビシン、ドキソルビシン、マイトマイシンC、又はブレオマイシンなどを導入した薬物複合体が開示されている。この発明におけるマンノグルカン誘導体としては、カルボキシメチル化されたマンノグルカン・ポリアルコールも用いられている。しかしながら、

マンノグルカン誘導体は枝分かれが多いので構造が複雑であり、医薬品の製造に適する均一な品質のものを入手することが困難であった。

また、国際公開 W094/19376 号には、カルボキシル基を有する多糖のカルボキシル基にペプチド鎖（アミノ酸数 1~8）が結合されており、さらにこのペプチド鎖を介してドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシンC、又はブレオマイシンなどを結合した薬物複合体が開示されている。カルボキシル基を有する多糖としては、本来的にその構造中にカルボキシル基を有する多糖（例えば、ヒアルロン酸等）のほか、本来的にその構造中にカルボキシル基を有しない多糖（例えば、プルラン、デキストラン、キチン等）の水酸基にカルボキシC<sub>1-4</sub>アルキル基を導入するか、あるいはマロン酸やコハク酸などの多塩基性酸をエステル結合させてカルボキシル基を導入した多糖類などが例示されている。この薬物複合体は、ドキソルビシンなどの薬剤と上記多糖部分とがスペーサーを介して結合していることを構造上の特徴としており、ドキソルビシンより優れた抗腫瘍効果が得られるとともに、毒性・副作用が軽減されている。

その他、ポリアルコール化多糖誘導体を薬物の送達キャリアーとして用いた薬物複合体に関する技術について、「多糖-ペプチド-ドキソルビシン複合体に関する研究・多糖キャリアーの血中安定性と抗腫瘍効果の関係」（第10回日本DDS学会講演要旨集，279，1994）；「多糖-ペプチド-ドキソルビシン複合体に関する研究・体内動態と抗腫瘍効果」（第9回日本薬物動態学会年会講演要旨集，292，1994）；第19回研究開発動向セミナー（医薬品機構主催）要旨集，D-9，1995；及び「多糖キャリアーによる腫瘍への薬物送達に関する研究」（第12回コロイド・界面技術シンポジウム，日本化学会，講演要旨集，51，1995）などの報告がある。

#### 発明の開示

本発明の課題は、抗腫瘍剤や抗炎症剤などの有効成分を腫瘍部位などに対して部位選択的に移行させることができる薬物複合体を提供することにある。より具体的には、抗腫瘍剤や抗炎症剤などの医薬化合物を部分構造として含む薬物複合体であって、血中に長時間滞留することができ、かつ、腫瘍部位や炎症部位に対して部位選択的に該医薬化合物を送り込むことができる薬物複合体を提供するこ

とが本発明の課題である。また、本発明の別の課題は、上記の特徴を有する薬物複合体の製造方法を提供することにある。

本発明者らは上記の課題を解決すべく国際公開 W094/19376 号に開示された薬物複合体の改良を試みた結果、カルボキシル基を有する多糖類に替えて、デキストランをポリアルコール化したデキストラン誘導体をカルボキシ $C_{1-4}$ アルキル化したものを多糖部分として用いると、投与後の医薬が長時間にわたって高濃度で維持されるとともに、腫瘍部位や炎症部位に対する部位選択性を大幅に改善できることを見い出した。また、このような化合物では抗腫瘍効果などの主薬効が顕著に増強されている一方、毒性は低減されていることを見いだした。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

すなわち本発明は、1個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した2~8個のアミノ酸からなるスペーサーを介してカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とが結合していることを特徴とする薬物複合体を提供するものである。また本発明の別の態様により、上記の薬物複合体からなる医薬；及び上記の薬物複合体を有効成分として含む医薬組成物、例えばバイアルに充填された凍結乾燥品の形態の注射用若しくは点滴用の製剤などが提供される。さらに本発明の別の態様によれば、上記の薬物複合体の製造方法が提供される。

上記の発明の好ましい態様として、カルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールであることを特徴とする上記薬物複合体；カルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールがカルボキシメチルデキストランポリアルコールである上記薬物複合体；医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である上記薬物複合体；医薬化合物が濃度に依存した抗腫瘍作用を発現する抗腫瘍剤（より高い濃度でより強い抗腫瘍作用を発現する抗腫瘍剤：本明細書において濃度依存型の抗腫瘍剤という場合がある）である上記薬物複合体；医薬化合物が時間に依存した抗腫瘍作用を発現する抗腫瘍剤（より長い作用時間でより強い抗腫瘍作用を発現する抗腫瘍剤：本明細書において時間依存型の抗腫瘍剤という場合がある）である上記薬物複合体；

並びに、抗腫瘍剤がドキソルビシン又は (1S, 9S)-1- アミノ-9- エチル-5- フルオロ-2, 3- ジヒドロ-9- ハイドロキシ-4- メチル-1H, 12H-ベンゾ[de]ピラノ[3', 4': 6, 7] インドリジノ[1, 2-b] キノリン-10, 13(9H, 15H)- ジオンである上記薬物複合体が提供される。

また、同様に好ましい態様として、スペーサーが -X-Z- で表されるジペプチド (-X-Z- は疎水性アミノ酸(X) と親水性アミノ酸(Z) とがそれぞれN末端側及びC末端側となってペプチド結合して形成されるジペプチドのN末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基から、それぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する) であるか、又は該ジペプチドを部分ペプチド配列として含むスペーサーである上記薬物複合体；疎水性アミノ酸がフェニルアラニンであり、親水性アミノ酸がグリシンである上記薬物複合体；スペーサーが (N末端)-Gly-Gly-Phe-Gly- である上記薬物複合体；並びに、抗腫瘍剤の残基の導入量が 1~15 重量%、好ましくは 3~10 重量%、さらに好ましくは 5~6 重量% の範囲である上記薬物複合体が提供される。

本発明の特に好ましい態様として、 $H_2N-Gly-Gly-Phe-Gly-COOH$  で示されるペプチドのN末端がカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基に酸アミド結合しており、該ペプチドのC末端が (1S, 9S)-1- アミノ-9- エチル-5- フルオロ-2, 3- ジヒドロ-9- ハイドロキシ-4- メチル-1H, 12H-ベンゾ[de]ピラノ[3', 4': 6, 7] インドリジノ[1, 2-b] キノリン-10, 13(9H, 15H)- ジオンの1-アミノ基と酸アミド結合した上記薬物複合体；(1S, 9S)-1- アミノ-9- エチル-5- フルオロ-2, 3- ジヒドロ-9- ハイドロキシ-4- メチル-1H, 12H-ベンゾ[de]ピラノ[3', 4': 6, 7] インドリジノ[1, 2-b] キノリン-10, 13(9H, 15H)- ジオン残基の導入量が 2~10 重量% の範囲である上記薬物複合体；並びに、カルボキシ $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールが、分子量 5,000~500,000 の範囲、好ましくは 50,000~450,000 の範囲、より好ましくは 200,000~400,000 の範囲のカルボキシメチルデキストランポリアルコールであり、カルボキシメチル化度が構成糖残基あたり 0.01~2.0 の範囲、好ましくは 0.1~1.0 の範囲、より好ましくは 0.3~0.5 の範囲である上記薬物複合体が提供される。

本発明の別の態様によれば、カルボキシ $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコー

ルからなる薬物送達のキャリアーが提供される。この発明の好ましい態様では、カルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールの分子量が 5,000~500,000 の範囲、好ましくは50,000~450,000 の範囲、より好ましくは 200,000~400,000 の範囲であり、カルボキシ $C_{1-4}$ アルキル化度が構成糖残基あたり0.01~2.0 の範囲、好ましくは 0.1~1.0 の範囲、より好ましくは 0.3~0.5 の範囲である。カルボキシメチルデキストランポリアルコールが最も好ましいキャリアーとして提供される。この発明の別の観点からは、医薬化合物の残基と結合したカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールを含む薬物複合体の製造のためのカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールの使用が提供される。

この発明の好ましい態様として、医薬化合物の残基とカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールとがスペーサーを介して結合した薬物複合体の製造のためのカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールの使用；並びに1個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した 2~8 個のアミノ酸からなるスペーサーを介してカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とが結合していることを特徴とする薬物複合体の製造のためのカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールの使用が提供される。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の薬物複合体（例8で製造したもの）のGPC チャートを示す図である。

第2図は、本発明の薬物複合体（例8で製造したもの）の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第3図は、本発明の薬物複合体（例9で製造したもの）のGPC チャートを示す図である。

第4図は、本発明の薬物複合体（例9で製造したもの）の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第5図は、本発明の薬物複合体（例10で製造したもの）の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第6図は、本発明の薬物複合体（例15で製造したもの）のGPC チャートを示す図

である。

第7図は、本発明の薬物複合体（例15で製造したもの）の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第8図は、本発明の薬物複合体（例28で製造したもの）のGPC チャートを示す図である。

第9図は、本発明の薬物複合体（例28で製造したもの）の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第10図は、本発明の薬物複合体（例29で製造したもの）のGPC チャートを示す図である。

第11図は、本発明の薬物複合体（例29で製造したもの）の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第12図は、本発明の薬物複合体（例34で製造したもの）のGPC チャートを示す図である。

第13図は、本発明の薬物複合体（例34で製造したもの）の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第14図は、本発明の薬物複合体（例39で製造したもの）のGPC チャートを示す図である。

第15図は、本発明の薬物複合体（例39で製造したもの）の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第16図は、本発明の薬物複合体（例41で製造したもの）のGPC チャートを示す図である。

第17図は、本発明の薬物複合体（例41で製造したもの）の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第18図は、本発明の薬物複合体（例44で製造したもの）のGPC チャートを示す図である。

第19図は、本発明の薬物複合体（例44で製造したもの）の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第20図は、本発明の薬物複合体（例47で製造したもの）のGPC チャートを示す図である。

第21図は、本発明の薬物複合体（例47で製造したもの）の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第22図は、本発明の薬物複合体（例55で製造したもの）のGPC チャートを示す図である。

第23図は、本発明の薬物複合体（例55で製造したもの）の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第24図は、本発明の薬物複合体（例15で製造したもの）の体内動態を示す図である。図中の各点は3例の平均値を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の薬物複合体は、1個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した2~8個のアミノ酸からなるスペーサーを介してカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とが結合していることを特徴としている。

本発明の薬物複合体に含まれる医薬化合物の残基は、例えば、抗腫瘍剤、抗炎症剤、抗菌剤などの医薬としてヒトを含む哺乳類の病気の治療及び／又は予防に用いられる医薬化合物に由来し、その部分構造により構成される。もっとも、該残基が由来する医薬化合物は上記のものに限定されることはない。また、医薬化合物としてはスペーサーとの結合に関与できる1又は2以上の反応性官能基（例えば、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、チオール基、エステル基など）を有するものであればいかなるものを用いてもよい。本明細書において医薬化合物という場合には、それ自体が医薬作用を有する化合物の主要構造をその部分構造として含み生体内で該化合物を再生することができるプロドラッグ化合物も含まれる。

より具体的には、本明細書において医薬化合物の残基とは、スペーサーと医薬化合物残基との結合が医薬化合物中の反応性官能基とスペーサー中の反応性官能基との反応（例えば脱水縮合など）により形成されたと仮定した場合において、結合後の化合物中に存在する医薬化合物に由来する部分構造を意味している。例えば、医薬化合物が  $D-NH_2$ ,  $D-COOH$ ,  $D-COOR$ ,  $D-OH$ ,  $D-SH$ ,  $D-CONH_2$ ,  $D-NH-COOR$

(R は低級アルキル基等) で表される場合、医薬化合物の残基はそれぞれ D-NH- (D-NH-CO-Q など), D-CO- (D-CO-NH-Q, D-CO-O-Q, D-CO-S-Q など), D-CO- (D-CO-NH-Q, D-CO-O-Q, D-CO-S-Q など), D-O- (D-O-CO-Q, D-O-Q など), D-S- (D-S-CO-Q, D-S-Q など), D-CONH- (D-CO-NH-CO-Q など), D-NH-CO- (D-NH-CO-O-Q, D-NH-CO-NH-Q など) で表される (カッコ内はスペーサーと医薬化合物残基との結合を示し、Q はスペーサーから反応性官能基を除いた残りの部分構造を示す)。もっとも、スペーサーと医薬化合物残基との結合の種類は上記のものに限定されることはない。医薬化合物の残基は、スペーサーの N 末端アミノ基又は C 末端カルボキシル基のほか、スペーサーを構成するアミノ酸に存在する反応性官能基に結合していてもよい。

医薬化合物の残基としては、例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシン C、ブレオマイシン、シクロシチジン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メトトレキセート、白金系抗腫瘍剤 (シスプラチン若しくはその誘導体)、タキソール若しくはその誘導体、カンプトテシン若しくはその誘導体 (特開平 6-87746 号公報に記載された抗腫瘍剤、好ましくは請求項 2 に記載された (1S, 9S)-1- アミノ-9- エチル-5- フルオロ-2, 3- ジヒドロ-9- ハイドロキシ-4- メチル-1H, 12H-ベンゾ[de]ピラノ[3', 4':6, 7] インドリジノ[1, 2-b] キノリン-10, 13(9H, 15H)- ジオン等) などの抗腫瘍剤の残基を好適に用いることができる。また、例えば、コハク酸ヒドロコルチゾン、コハク酸プレドニゾロンなどのステロイド系抗炎症剤、又はメフェナム酸、フルフェナム酸、ジクロフェナク、イブプロフェン、チノリジンなどの非ステロイド系抗炎症薬の残基も好適である。

医薬化合物の残基と結合するスペーサーとしては、1 個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した 2~8 個のアミノ酸からなるスペーサーを用いることができる。より具体的には、スペーサーは、1 個のアミノ酸の残基 (アミノ酸のアミノ基及びカルボキシル基からそれぞれ 1 個の水素原子及び 1 個の水酸基を除いた残基を意味する)、又はペプチド結合した 2 ないし 8 個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの残基 (N 末端のアミノ基及び C 末端のカルボキシル基からそれぞれ 1 個の水素原子及び 1 個の水酸基を除いた残基を意味する) の形態を有している。

好ましいスペーサーは2～6個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの残基である。スペーサーを構成するアミノ酸の種類は特に限定されないが、例えば、L-又はD-アミノ酸、好ましくはL-アミノ酸を用いることができ、 $\alpha$ -アミノ酸のほか、 $\beta$ -アラニン、 $\epsilon$ -アミノカプロン酸、 $\gamma$ -アミノ酪酸などを用いてもよい。このような $\alpha$ -アミノ酸以外のアミノ酸は、多糖誘導体に近接した位置に配置されることが好ましい。

スペーサーの結合方向は特に限定されないが、一般的には、カルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基にスペーサーのN末端を酸アミド結合によって結合し、医薬化合物のアミノ基にスペーサーのC末端を結合することができる。また、例えば、ペプチドスペーサの構成単位としてリジン残基を含めておき、リジン残基の $\alpha$ -アミノ基及び $\epsilon$ -アミノ基をそれぞれ他のアミノ酸のカルボキシル基と酸アミド結合させると、ペプチドスペーサーの両末端がN末端になるので、医薬化合物のカルボキシル基を結合することが可能になる。さらに、スペーサー中に1個又は2個以上のジアミン化合物またはジカルボン酸化合物の残基（例えばエチレンジアミンなどのジアミンの残基やコハク酸などのジカルボン酸の残基）を構成単位として含めておき、それぞれ両末端がN末端のスペーサー及び両末端がC末端のスペーサーを利用してもよい。

スペーサーのアミノ酸配列は特に限定されないが、例えば、スペーサーが-X-Z-で表されるジペプチドの残基（Xは疎水性アミノ酸の残基を示し、Zは親水性アミノ酸の残基を示し、-X-Z-は疎水性アミノ酸(X)と親水性アミノ酸(Z)とがそれぞれN末端側及びC末端側となってペプチド結合したジペプチドのN末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）であるか、又は該ジペプチドの残基を部分ペプチド配列として含むスペーサーを好適に用いることができる。疎水性アミノ酸としては、例えば、フェニルアラニン、チロシン、ロイシンなどを用いることができ、親水性アミノ酸としては、例えば、グリシン、アラニンなどを用いることができる。スペーサーがこのようなジペプチド残基の繰り返し配列（例えば-X-Z-X-Z-、-X-Z-X-Z-X-Z-など）を有していてもよい。

このようなジペプチド構造を含むスペーサーを用いると、スペーサーがペプチ

ダーゼが豊富であると考えられる腫瘍部位や炎症部位で加水分解され、当該部位において医薬化合物が高濃度に遊離する。上記ジペプチドを含むスペーサーと医薬化合物とが結合して形成される部分構造は本発明の薬物複合体の好ましい部分構造である。医薬化合物の残基として、例えば、濃度依存型の抗腫瘍剤（例えば、ドキソルビシン）などを用いる場合には、 $-X-Z-$  で示される上記のジペプチド残基からなるスペーサー又は該ジペプチド残基を部分ペプチド配列として含むスペーサーを用いることが特に好ましい。

また、医薬化合物の残基として、一定の濃度以上で作用時間の持続を必要とする時間依存型の抗腫瘍剤を用いる場合にも、上記のスペーサーを用いることによって高い抗腫瘍効果を達成できる場合があり、例えば、特開平6-87746号公報に記載された抗腫瘍剤、好ましくは請求項2に記載された抗腫瘍剤が挙げられる。一般的には、上記のスペーサーに限定されることなく、抗腫瘍剤の作用機作、体内動態や毒性発現の特徴、体内での抗腫瘍剤の遊離性などの観点から好ましいスペーサーを選択する必要がある。なお、一般的に、増殖の速い癌種に対しては、短時間に高濃度の医薬化合物を遊離することができる上記のスペーサーを選択することが好ましい。

スペーサーの具体例を以下の表に示すが、本発明の薬物複合体に用いられるスペーサーは以下のものに限定されることはなく、医薬化合物の至適な遊離速度を与えるように当業者が適宜選択可能であることはいうまでもない。表中、ペプチド配列は左側がN末端であり、C末端側に医薬化合物の残基が結合する。D-PheはD-フェニルアラニン残基を示し、その他のアミノ酸はL-アミノ酸を示す。なお、遊離速度の大小はドキソルビシンを結合した薬物複合体の Walker 256 担癌ラットに対する薬効の発現の程度、または Walker 256 担癌ラットの腫瘍部位における遊離ドキソルビシン濃度によって判定したものである。これらのスペーサーのうち、ドキソルビシンに対しては (N 末端)-Gly-Gly-Phe-Gly-等の短時間に高濃度の医薬化合物を遊離することができるスペーサーを用いることが好ましい。

表 1

---

(a) 遊離速度が大きいスペーサー

-Leu-Gly-

-Tyr-Gly-

-Phe-Gly-

-Gly-Phe-Gly-

-Gly-Gly-Phe-Gly-

-Gly-Phe-Gly-Gly-

-Phe-Gly-Gly-Gly-

-Phe-Phe-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Phe-Gly-

(b) 遊離速度が比較的大きいスペーサー

-Gly-Gly-Phe-Phe-

-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-

(c) 遊離速度が比較的小さいスペーサー

-Phe-Phe-

-Ala-Gly-

-Pro-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Phe-

(d) 遊離速度が小さいスペーサー

-Gly-

-D-Phe-Gly-

-Gly-Phe-

-Ser-Gly-

-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Gly-

---

本発明の薬物複合体の多糖誘導体部分を構成するカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールのポリアルコール化度は特に限定されないが、カルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下においてデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールであることが好ましい。例えば、デキストランに大過剰の過ヨウ素酸ナトリウムと水素化ホウ素ナトリウムとを順次作用させてデキストランを実質的に完全にポリアルコール化したデキストランポリアルコールを本発明の薬物複合体の原料化合物として好適に用いることができる。もっとも、デキストランのポリアルコール化の方法は上記のものに限定されることはなく、当業者に利用可能なものであればいかなる方法を採用してもよい。

デキストランの種類は特に限定されず、 $\alpha$ -D-1, 6-結合を任意の割合で含んでもよい。例えば、 $\alpha$ -D-1, 6-結合の割合が85%以上、90%以上、又は95%以上のデキストランなどを用いることができる。デキストランの分子量は特に限定されないが、例えば10,000程度から2,000,000程度のもの、好ましくは50,000程度から800,000程度のものを用いることができる。カルボキシ $C_{1-4}$ アルキル基を構成する $C_{1-4}$ アルキルとしては、直鎖又は分枝鎖の $C_{1-4}$ アルキル、具体的にはメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基などを用いることができるが、好ましくはメチル基を用いることができる。カルボキシ $C_{1-4}$ アルキル化は、例えば、デキストランポリアルコールの水酸基に対してクロル酢酸、ブロム酢酸、 $\alpha$ -クロルプロピオン酸、 $\alpha$ -メチル- $\alpha$ -クロルプロピオン酸、 $\beta$ -クロルプロピオン酸、 $\alpha$ -メチル- $\beta$ -クロルプロピオン酸、 $\alpha$ -クロル酪酸、 $\beta$ -クロル酪酸、 $\gamma$ -クロル酪酸などのハロゲン化 $C_{1-4}$ アルキルカルボン酸、好ましくはクロル酢酸を反応させて水酸基を部分的又は完全にカルボキシ $C_{1-4}$ アルキル化することにより行うことができる。

例えば、デキストランポリアルコールを反応に関与しない不活性溶媒（例えば、水、*N,N*-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等）に溶解し、塩基（例えば、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等）の存在下にハロゲン化 $C_{1-4}$ アルキルカルボン酸またはその塩を添加し、氷冷下ないし100℃程度の温度範囲で数分ないし数日間反応させればよい。カルボキシ $C_{1-4}$ アルキル基の導入の程度は、例えば、カ

カルボキシ $C_{1-4}$ アルキル化の反応温度や試薬として用いるハロゲン化 $C_{1-4}$ アルキルカルボン酸及び塩基の量を適宜選択することにより容易に調節可能であり、そのような手段は当業者に周知である。デキストランポリアルコールの水酸基に対するカルボキシ $C_{1-4}$ アルキル化の程度は特に限定されないが、例えば、構成糖残基あたり0.01~2.0の範囲、好ましくは0.1~1.0、より好ましくは0.3~0.5の範囲である。カルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールの分子量は、ゲルろ過法で測定した場合に5,000から500,000程度、好ましくは50,000~450,000程度、より好ましくは200,000~400,000程度である。

上記のカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールは、薬物送達のキャリアーとして有用である。医薬化合物とカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールとを結合させた薬物複合体は、例えば、腫瘍選択性などの優れた選択性を有しており、また高い血中濃度を長時間維持できるという特徴がある。医薬化合物とカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールとの結合としては、例えば、エステル結合などで両者を直接結合させる方法、上記に説明したスペーサーなどの適宜のスペーサーを介して両者を結合させる方法などを採用することができる。

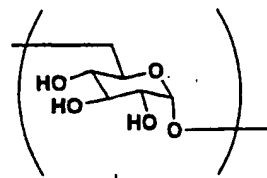
スペーサーを介して結合する薬物複合体に関しては、上記のようにして得られるカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基に対して、医薬化合物の残基と結合させたスペーサーを結合することにより本発明の薬物複合体を製造することができる。スペーサーとカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基との結合は、一般的には、スペーサーのN末端アミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とを酸アミド結合により結合させることにより形成できる。もっとも、スペーサーとカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基との結合は上記のものに限定されることはなく、他の化学結合や1又は2以上のスペーサーを利用した結合であってもよい。例えば、スペーサーのC末端カルボキシル基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とにより酸無水物を形成させてもよく、また、エチレンジアミン等のジアミン化合物をスペーサーとして用いてそれぞれのカルボキシル基をジアミンの各アミノ基に酸アミド結合させても

よい。

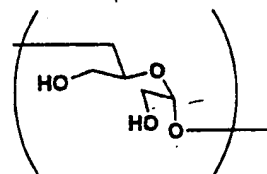
スペーサーのN末端アミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とを酸アミド結合により結合させる場合には、ペプチド鎖の合成に用いる通常の脱水縮合剤、例えば、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)のようなN,N'-ジシクロアルキルカルボジイミド類、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDAPC)等のカルボジイミド誘導体、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)のようなベンゾトリアゾール誘導体のほか、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(EEDQ)などを用いることができる。また、活性エステル法や酸ハライド法などにより反応を行ってもよい。

カルボキシメチルデキストランポリアルコールに導入する医薬化合物残基の量は特に限定されないが、医薬化合物残基の物理化学的性質、並びに本発明の薬物複合体の体内動態、薬効、及び毒性などの観点から適宜選択すべきである。一般的には、0.1～30重量%、好ましくは1～15重量%、さらに好ましくは3～10重量%、特に好ましくは5～6重量%程度の範囲を選択することができる。カルボキシメチルデキストランポリアルコールに導入された医薬化合物残基の割合は、例えば、吸光度分析などにより容易に決定することが可能である。

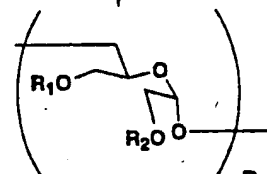
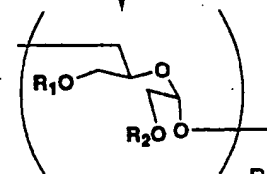
本発明の薬物複合体の製造方法の一例として、特開平6-87746号公報の請求項2に記載された抗腫瘍剤である医薬化合物の残基を導入する場合について、製造方法を以下のスキームに示すが、本発明の薬物複合体及びその製造方法はこのスキームに示されたものに限定されることはない。下記スキームにおいて、医薬化合物残基の導入量は、例えば1～15重量%、好ましくは2～10重量%程度である。また、下記スキーム中には、ポリアルコール類の構成単位のうち1個又は2個のカルボキシメチル基が導入された構成単位のみを例示的に記載したが、本発明の薬物複合体の多糖誘導体部分は上記構成単位の繰返しによって構成されるものではないことを理解すべきである。



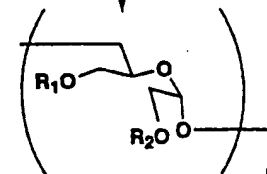
デキストラン

1) NaIO<sub>4</sub>2) NaBH<sub>4</sub>

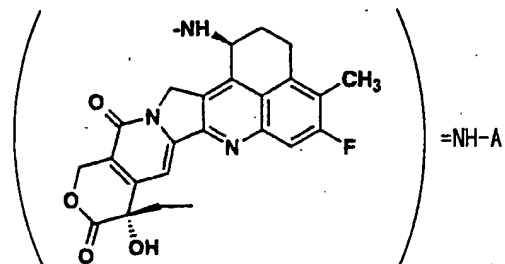
デキストランポリアルコール

ClCH<sub>2</sub>COOH/NaOHカルボキシメチルデキストランポリアルコール  
ナトリウム塩R<sub>1</sub>: -H or -CH<sub>2</sub>COONaR<sub>2</sub>: -H or -CH<sub>2</sub>COONaBio-Rad AG 50W-X2(H<sup>+</sup>) column

カルボキシメチルデキストランポリアルコール

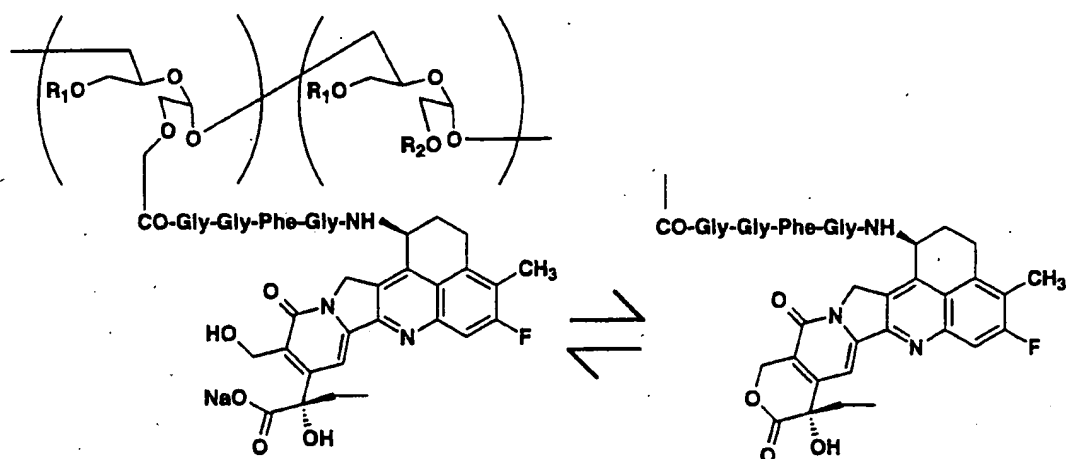
R<sub>1</sub>: -H or -CH<sub>2</sub>COOHR<sub>2</sub>: -H or -CH<sub>2</sub>COOHNEt<sub>3</sub>カルボキシメチルデキストランポリアルコール  
トリエチルアンモニウム塩R<sub>1</sub>: -H or -CH<sub>2</sub>COOH·NEt<sub>3</sub>R<sub>2</sub>: -H or -CH<sub>2</sub>COOH·NEt<sub>3</sub>1) Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A  
EEDQ  
2) NaOH

本発明の薬物複合体



=NH-A

## 本発明の薬物複合体



上記の医薬化合物は、酸性水性媒体中（例えばpH 3程度）ではラクトン環を形成した化合物（閉環体）に平衡が偏り、一方、塩基性水性媒体中（例えばpH 10程度）ではラクトン環が開環した化合物（開環体）に平衡が偏ることが知られているが、このような閉環体及び開環体に対応する残基を導入した薬物複合体は同等の抗腫瘍効果を有しており、いずれも本発明の範囲に包含されることはいうまでもない。なお、反応系中にラクトン環の開環した反応種が存在すると、ラクトン環に由来するカルボキシル基とスペーサー由来のアミノ基との間で縮合反応が進行して著しく反応収率が低下するだけでなく、目的とする均一な薬物複合体が得られない場合がある。このような副反応は反応種として選択的に閉環体を用いることによって回避することができる。

すなわち、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩をトリエチルアンモニウム塩に変換した後、非水系（水を含まない有機溶媒中）でカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基に対して、上記の医薬化合物の残基を結合させたスペーサーのN末端アミノ基を縮合させることにより、副反応を抑制することができ、効率的に目的物を製造することが可能になる。有機溶媒に溶解可能なカルボキシメチルデキストランポリアルコールの塩としては、例えば、トリエチルアンモニウム塩やトリメチルアンモニウム塩などのトリアルキルアンモニウム塩のほか、N-メチルピロリジン、N-メチルモルホリン、ジメチルアミノピリジン（DMAP）などの有機塩基の塩を用いることが可能である。

有機溶媒としては、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなどを用いることができる。

本発明の薬物複合体は、医薬化合物の残基の種類（例えば、抗腫瘍剤または抗炎症剤などの医薬化合物の残基）に応じて、所望の医薬活性を腫瘍部位や炎症部位などの局所において特異的に発現させることができ、かつ、医薬化合物自体の有する毒性を低減できるという特徴を有する。いかなる特定の理論に拘泥するわけではないが、本発明の薬物複合体の多糖誘導体部分（例えばカルボキシメチルデキストランポリアルコール）は極めて優れた血中滞留性及び腫瘍・炎症部位への集積性を有するので薬物送達のキャリアーとして有用であり、本発明の薬物複合体は腫瘍選択性及び炎症部位選択性を有している。また、腫瘍部位や炎症部位ではプロテアーゼ（ペプチダーゼ）が発現されていると考えられるので、本発明の薬物複合体のスペーサーは容易に加水分解され、遊離した医薬化合物が薬効を発揮する。

本発明の薬物複合体を含む医薬は、通常、凍結乾燥品などの形態でバイアル等に充填することができ、用時溶解型の注射用または点滴用製剤等の非経口投与用製剤として臨床に提供されるが、本発明の医薬の製剤形態は上記態様に限定されることはない。上記製剤の製造には、例えば、溶解補助剤、pH調節剤、安定化剤など当業界で利用可能な製剤用添加物を用いることができる。本発明の医薬の投与量は特に限定されないが、通常は、医薬化合物残基を構成する医薬化合物の投与量、本発明の薬物複合体中に導入された医薬化合物の残基の量、患者の状態や疾患の種類などを勘案して決定すべきである。例えば、特開平6-87746号公報の請求項2に記載された抗腫瘍剤の残基が約6重量%程度の割合で導入された本発明の薬物複合体を非経口投与する場合には、一般に一日あたり体表面積  $1 \text{ m}^2$  につき約1~500 mg程度、好ましくは約10~100 mgの範囲で一回投与し、3~4週毎に繰り返すことが好ましい。

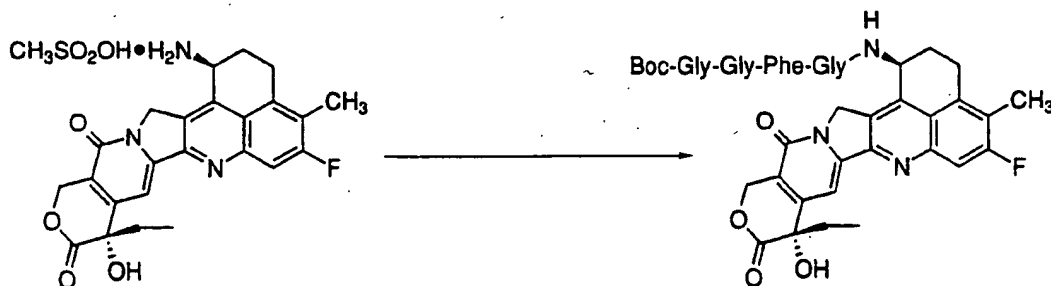
#### 実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。実施例中、「A-NH-」は、特開平6-87746号公

報の請求項2に記載された医薬化合物（実施例中で「DX-8951」という場合がある）などのようにラクトン環を有する医薬化合物において、ラクトン環が閉環した医薬化合物を  $A-NH_2$  で表した場合の医薬化合物残基を表し、その一例は、上記のスキーム中に  $A-NH-$  で示した基（ラクトン環を形成したもの）である。また、 $A'-NH-$  は、 $A-NH-$  で表される医薬化合物残基中のラクトン環が閉環型若しくは開環型のいずれか又はそれらの混合形態であることを示し、 $-DXR$  はドキソルビシン由来の残基を示し、 $-D51-7059$  は例55に示されるタキソール誘導体由来の残基を示す。

また、実施例中、特に言及しない場合には、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度（構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度）は、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩を遊離酸型に変換した後、0.1N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解して0.1N 塩酸で滴定することにより求めた。カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩の水溶液を Bio-Rad AG50W-x  $2(H^+)$  型）カラムに付して通過液を凍結乾燥して試料として用いた。この試料を所定過剰量の0.1N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、フェノールフタレンを指示薬として0.1N 塩酸で滴定した。試料の採取量を  $s(mg)$ 、0.1N 水酸化ナトリウム水溶液の所定過剰量を  $a(ml)$ 、0.1N 塩酸の滴定量を  $b(ml)$  とし、カルボキシメチル化度を  $13.4(a-b)/[s-5.8(a-b)]$  の式により求めた。また、薬物の導用量（重量%）は、薬物の特性吸収を利用した吸光度分析（362 nm付近）から求めた。さらに、ゲル濾過法は次の条件に従って行った（カラム：TSK gel G4000 PW<sub>XL</sub>、溶離液：0.1M NaCl、流速：0.8 ml/min、カラム温度：40°C）。

例1： $3'-N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A$  ( $A-NH_2 = DX-8951$ )



Boc-Gly-Gly-Phe-Gly (600 mg)および N- ヒドロキシスクシンイミド (160 mg) を N, N- ジメチルホルムアミド (20 ml)に溶解し、4 °Cに冷却した後、N, N'- ジシクロヘキシルカルボジイミド (280 mg) を添加した。この溶液に特開平6-87746 号公報の請求項 2 に記載された医薬化合物のメタンスルホン酸塩 (600 mg: 上記公報の実施例50に記載された化合物) とトリエチルアミン (0.16 ml)を溶解したN, N-ジメチルホルムアミド (30 ml)溶液を加えて、遮光下に室温で16時間攪拌しながら反応させた。この反応液を減圧乾固し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液: 0.5%酢酸を含むジクロロメタン: メタノール = 10:1 溶液) で精製して標記化合物 (1.0 g)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8.40 (d, 1H,  $J=8.3$  Hz), 8.10-8.17 (m, 2H), 7.91-8.01 (m, 1H), 7.78 (d, 1H,  $J=10.75$  Hz), 7.32 (s, 1H), 6.94-6.96 (m, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.57 (t, 1H,  $J=4.5$  Hz), 5.43 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 3.77 (dd, 2H,  $J=5.85$  Hz,  $J=8.80$  Hz), 3.70 (d, 2H,  $J=4.40$  Hz), 3.65 (d, 2H,  $J=5.35$  Hz), 3.56 (d, 2H,  $J=5.85$ ), 3.15-3.25 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.86 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 0.88 (t, 3H,  $J=7.35$ ).

Mass (FAB);  $m/e$  854 ( $M+1$ )

例 2 : 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A ( $A-NH_2$  =DX-8951)の合成

Boc-Gly-Gly-Gly-Phe (600 mg)およびN-ヒドロキシスクシンイミド (160 mg) をN, N-ジメチルホルムアミド (20 ml)に溶解し、4 °Cに冷却した後、N, N'- ジシクロヘキシルカルボジイミド (280 mg) を添加した。この溶液に DX-8951 のメタンスルホン酸塩 (600 mg)とトリエチルアミン (0.16 ml)を溶解したN, N-ジメチルホルムアミド (30 ml)溶液を加えて、遮光下に室温で16時間攪拌しながら反応させた。この反応液を減圧乾固し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液: 0.5%酢酸を含むジクロロメタン: メタノール = 10:1 溶液) で精製して標記化合物 (700 mg)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8.57 (d, 1H,  $J=7.8$  Hz), 8.19 (d, 1H), 8.05-8.07 (m, 2H), 7.79 (d, 1H,  $J=11.2$  Hz), 7.32 (s, 1H), 7.10 (d, 2H,  $J=7.8$  Hz), 6.93-7.03 (m, 4H), 6.51 (s, 1H), 5.52-5.55 (m, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.18 (d, 1H,  $J=18.5$  Hz), 4.84

(d, 1H, J = 18.5Hz), 4.57-4.59 (m, 1H), 3.57-3.71 (m, 6H), 3.15-3.25 (m, 2H), 3.00-3.02 (m, 1H), 2.80-2.90 (m, 1H), 2.40 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.86 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, J = 7.35Hz).

Mass (FAB); m/e 854 (M+1)

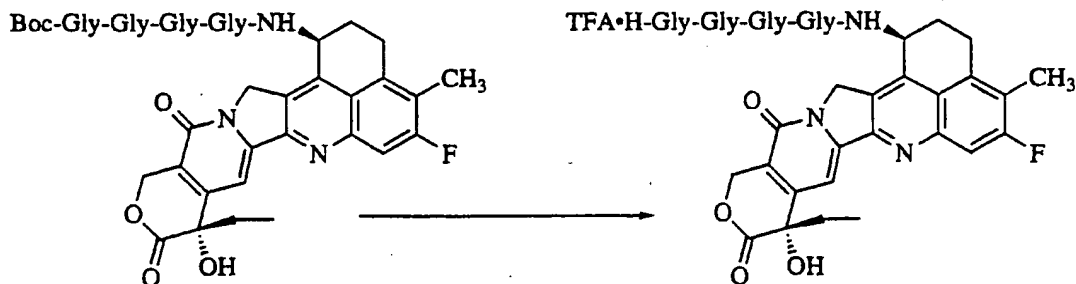
例 3 : 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Gly-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> = DX-8951) の合成

Boc-Gly-Gly-Gly-Gly (120 mg) および N-ヒドロキシスクシンイミド (39 mg) を N, N-ジメチルホルムアミド (20 ml) に溶解し、4 °C に冷却した後、N, N'-ジクロヘキシルカルボジイミド (70 mg) を添加した。この溶液に DX-8951 のメタンスルホン酸塩 (150 mg) とトリエチルアミン (0.039 ml) を溶解した N, N-ジメチルホルムアミド (10 ml) 溶液を加えて、遮光下に室温で 16 時間撹拌しながら反応させた。この反応液を減圧乾固し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液: ジクロロメタン: メタノール = 10:1 溶液) で精製して標記化合物 (100 mg) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.40 (d, 1H, J = 8.3 Hz), 8.10-8.17 (m, 2H), 7.91-8.01 (m, 1H), 7.78 (d, 1H, J = 10.75 Hz), 7.32 (s, 1H), 6.94-6.96 (m, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.57 (t, 1H, J = 4.5Hz), 5.43 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 3.77 (dd, 2H, J = 5.85Hz, J = 8.80Hz), 3.70 (d, 2H, J = 4.40Hz), 3.65 (d, 2H, J = 5.35Hz), 3.56 (d, 2H, J = 5.85Hz), 3.15-3.25 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.86 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, J = 7.35Hz).

Mass (FAB); m/e 764 (M+1)

例 4 : 3'-N-(Gly-Gly-Gly-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> = DX-8951) トリフルオロ酢酸塩の合成



3'-N-(Boc-Gly-Gly-Gly-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> = DX-8951) (79 mg) をトリフルオロ酢

酸 (3 ml) に溶かし、1 時間放置した。溶媒を留去し、メタノール (30 ml) で共沸を 2 回、エタノール (30 ml) で共沸を 2 回行った後、残渣をエーテルで洗浄して、標記化合物 (80 mg) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 8.59-8.61 (m, 1H), 8.50 (d, 1H,  $J = 8.3\text{Hz}$ ), 8.21-8.27 (m, 2H), 7.91-8.01 (br, 3H), 7.81 (d, 1H,  $J = 11.2\text{Hz}$ ), 7.32 (s, 1H), 6.50-6.52 (br, 1H), 5.57-5.59 (m, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 3.80-3.82 (m, 3H), 3.70-3.75 (m, 3H), 3.15-3.25 (m, 2H), 2.41 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.86-1.88 (m, 2H), 0.88 (t, 3H,  $J = 7.35\text{Hz}$ ).

例 5 : カルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩の合成

デキストラン T2000 (10 g, ファルマシア社製, 平均分子量 2,000,000) を 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5, 1,000 ml) に溶解し、過ヨウ素酸ナトリウム (33.0 g) の水溶液 (1000 ml) を加えた。遮光しながら 4 °C で 10 日間攪拌した後、エチレングリコール (7.0 ml) を加え、一晩攪拌した。反応液を氷冷下で 8 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 7.5 に調整した。水素化ホウ素ナトリウム (14 g) を加えて溶解した後、室温で一晩攪拌した。反応液を氷冷し、酢酸で pH 5.5 に調整して 4 °C で 1 時間攪拌した後、氷冷下で 8 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 7.5 に調整した。得られた水溶液をバイオマックス-30 膜 (ミリポア社製) を用いて限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。高分子画分を凍結乾燥して、デキストランポリアルコールを得た。このデキストランポリアルコールを pH 3.0 で 1 時間処理した後、バイオマックス-50 膜で低分子画分を除去し、次いで高分子画分をバイオマックス-100 膜で除去し、凍結乾燥して精製デキストランポリアルコール (2.0 g) を得た。この物質の分子量 (ゲル濾過法、デキストラン標準) は、220 K であった。

この精製デキストランポリアルコール (1.8 g) を、水酸化ナトリウム (10.5 g) を水 (45 ml) に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸 (15 g) を加えて溶解させた後、室温で 20 時間反応させた。この反応液を酢酸で pH を 8 に調整した後、バイオマックス-10 膜を用いて限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。高分子画分を凍結乾燥して、カルボキシ

メチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩 (1.8 g)を得た。この物質の分子量 (ゲル濾過、デキストラン標準) は330 k であり、カルボキシメチル化度は0.8 であった。

上記のカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩 (300 mg) を水に溶解し、Bio-Rad AG50W-X2 (200-400 メッシュ、 $H^+$  型) カラム (1.5 × 8.6 cm) にのせ、水で溶出した。この溶出液にトリエチルアミン (0.5 ml) を加えた後、凍結乾燥してカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩 (380 mg) を得た。カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩 (各 300 mg) を上記と同様にカラム処理して、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩 (380 mg, 400 mg) を得た。

#### 例 6 : カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩の合成

上記例 5 で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩 (0.15 g) を、水酸化ナトリウム (1.05 g) を水 (4.5 ml) に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸 (1.5 g) を加えて溶解させた後、室温で18時間反応させた。この反応液を酢酸でpHを8 に調整し、90 ml のメタノール中に滴下した後、3 M 塩化ナトリウム水溶液 (0.15 ml) を加えて、析出した沈澱を遠心分離 (3500 rpm, 8 分) により集めた。この沈澱をメタノールで洗浄した後、水 (5 ml) に溶解し、3 M 塩化ナトリウム水溶液 (0.15 ml) を加えた。この水溶液をミリポアフィルター (0.45  $\mu m$ ) で濾過し、濾液を35 mlのエタノール中に滴下して、析出した沈澱を遠心分離 (3500 rpm, 8 分) により集めた。この沈澱をエタノールで洗浄した後、水に溶解し、透析膜 (スペクトラポア 1、カットオフ分子量 6,000-8,000) を用いて、純水に対して透析した。透析内液をミリポアフィルター (0.22  $\mu m$ ) で濾過した後に凍結乾燥してカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩 (0.18 g) を得た。この物質の糖残基あたりのカルボキシメチル化度 (アルカリ滴定法) は1.2 であった。

#### 例 7 : カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩の合成

例 5 で得た精製デキストランポリアルコール (0.2 g) を、水酸化ナトリウム (0.84 g) を水 (6 ml) に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶

液に氷冷下でモノクロル酢酸 (1.2 g)を加えて溶解させた後、室温で18時間反応させた。この反応液を酢酸でpHを8 に調整し、120 mlのメタノール中に滴下した後、3 M 塩化ナトリウム水溶液 (0.2 ml) を加えて、析出した沈澱を遠心分離 (3500 rpm, 8分) により集めた。この沈澱をメタノールで洗浄した後、水 (5 ml) に溶解し、3 M 塩化ナトリウム水溶液 (0.2 ml) を加えた。この水溶液をミリポアフィルター (0.45  $\mu$ m) で濾過し、濾液を 35 mlのエタノール中に滴下して、析出した沈澱を遠心分離 (3500 rpm, 8分) により集めた。この沈澱をエタノールで洗浄した後、水に溶解し、透析膜 (スペクトラポア 1、カットオフ分子量 6,000-8,000) を用いて、純水に対して透析した。透析内液をミリポアフィルター (0.22  $\mu$ m) で濾過した後、凍結乾燥してカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩 (0.20 g) を得た。この物質の糖残基あたりのカルボキシメチル化度 (アルカリ滴定法) は0.4 であった。

例 8 : カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-A' (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951) の合成

例 5 で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩 (380 mg, カルボキシメチル化度 0.8) をN,N-ジメチルホルムアミド (30 ml) に溶解した。この溶液に、3'-N-(Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951) のトリフルオロ酢酸塩 (49 mg) のN,N-ジメチルホルムアミド (5 ml) 溶液、トリエチルアミン (0.017 ml)、1-エトキシカルボニル -2-エトキシ -1,2-ジヒドロキシキノリン (380 mg) を順次加え、室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液を1 M 水酸化ナトリウム水溶液で pH 10に調整した後、25 mlのエタノール中に 5 ml ずつ滴下した。この混合物に3 M 塩化ナトリウム水溶液 (1 ml)、ジエチルエーテル (5 ml) を加えて、析出した沈澱を遠心分離 (3500 rpm, 8分) により集めた。

この沈澱を水に溶解し、透析膜 (スペクトルポア 1、カットオフ分子量 6,000-8,000) を用いて純水に対して透析し、透析内液をミリポアフィルター (0.22  $\mu$ m) で濾過した後、凍結乾燥した。得られた粗生成物を水 (30 ml) に溶解し、0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液でpH 9に調整し、37°Cで1時間処理した。この処理液を上記と同様に透析した後、透析内液をミリポアフィルター (0.22  $\mu$ m) で濾過し、凍結

乾燥して標記化合物を 289 mg 得た。本化合物を 0.1 M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC（カラム：東ソー株式会社製 TSK Gel PW-4000XL、溶媒：0.1 M NaCl、流速：0.8 ml/min）で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル（0.1 M トリス緩衝液、pH 9.0, 0.25 mg/ml）をそれぞれ図 1 及び図 2 に示す。本化合物の医薬化合物残基の含量を 0.1 M トリス緩衝液（pH 9.0）中での 362 nm における吸光度に基づいて定量したところ 5.3%（W/W）であった。

例 9：カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A'(A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)合成

3'-N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951) (50 mg) から例 4 と同様の方法により脱 Boc 化して得られる 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A のトリフルオロ酢酸塩を、例 8 と同様の方法に従って、例 5 で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩 (380 mg) に導入して標記化合物 (300 mg) を合成した。本化合物を 0.1 M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC（カラム：東ソー株式会社製 TSK Gel PW-4000XL、溶媒：0.1 M NaCl、流速：0.8 ml/min）で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル（0.1 M トリス緩衝液、pH 9.0, 0.19 mg/ml）をそれぞれ図 3 及び図 4 に示す。本化合物の医薬化合物残基の含量を 0.1 M トリス緩衝液（pH 9.0）中での 362 nm における吸光度に基づいて定量したところ 5.3%（W/W）であった。

例 10：カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Gly-Gly-NH-A'(A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)の合成

3'-N-(Boc-Gly-Gly-Gly-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951) (41 mg) から例 4 と同様の方法により脱 Boc 化して得られる 3'-N-(Gly-Gly-Gly-Gly)-NH-A のトリフルオロ酢酸塩を、例 8 と同様の方法に従って、例 5 で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩 (380 mg) に導入して標記化合物 (190 mg) を合成した。本化合物の紫外線吸収スペクトル（0.1 M トリス緩衝液、pH 9.0, 0.34 mg/ml）を図 5 に示す。本化合物の医薬化合物残基の含量を 0.1 M トリス緩衝液（pH 9.0）中での 362 nm における吸光度に基づいて定量したところ 5.3%（W/W）であった。

例 11：本発明の薬物複合体の抗腫瘍作用

マウス線維肉腫 Meth A 細胞  $1 \times 10^6$  個を BALB/c 系の雄マウス（7 週齢）の右鼠蹊部皮下に移植して Meth A 担癌マウスを作成した（1 群 7 匹）。7 日目に注射用蒸留水に溶解した例 9 の薬物複合体を Meth A 担癌マウスの尾静脈内に 4 日毎に 4 回投与した。移植後 21 日目に腫瘍を摘出して重量を測定し、腫瘍増殖抑制率を次式：腫瘍増殖抑制率(%) =  $[1 - (\text{検体投与群の平均腫瘍重量} / \text{コントロール群の平均腫瘍重量})] \times 100$  により算出した。その結果、例 9 で得られた本発明の薬物複合体は、毒性（体重減少）を発現することなく、上記医薬化合物自体（スペーサー及び多糖誘導体なし）に比較して抗腫瘍効果が大幅に増強されていた。多糖誘導体自体（例 5）及びスペーサーのみを導入した医薬化合物残基（例 1 の化合物から例 4 の方法に従って脱 BOC 化して得られたる  $\text{H}_2\text{N-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A}$  ( $\text{A-NH}_2 = \text{DX-8951}$ ) のトリフルオロ酢酸塩）は無効であった。

表 2

被検化合物	投与量(mg/kg)	抑制率(%)
医薬化合物自体	7.5 × 4	76
	1.875 × 4	46
	0.9375 × 4	36
例 9 の化合物	1.4 <sup>1)</sup> × 4	94
	0.7 <sup>1)</sup> × 4	59
	0.35 <sup>1)</sup> × 4	41

1) 医薬化合物換算量

#### 例 12：本発明の薬物複合体の抗腫瘍作用

例 11 と同様の方法により Meth A 担癌マウスを作成し（1 群 6 匹）、7 日目に例 8 及び例 9 の薬物複合体を単回投与した場合の抗腫瘍作用を比較した。その結果、抗腫瘍作用の程度は（多糖誘導体）-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' > （多糖誘導体）-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-A' > 医薬化合物自体であった。スペーサーを介することなく医

薬化合物残基を例5のカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基に直接結合した化合物（医薬化合物残基の導入量：6.2重量%）は無効であった。

表 3

被検化合物	投与量(mg/kg)	抑制率(%)
医薬化合物自体	60	77
	20	59
例8の化合物	10 <sup>1)</sup>	85
	5 <sup>1)</sup>	76
例9の化合物	5 <sup>1)</sup>	98
	2.5 <sup>1)</sup>	87

<sup>1)</sup> 医薬化合物換算量

#### 例13：カルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩の合成

デキストランT500（10 g, ファルマシア社製, 分子量 500K）を0.1 M 酢酸緩衝液（pH5.5, 1000 ml）に溶解し、過ヨウ素酸ナトリウム（33 g）の水溶液（1000 ml）を加えた。遮光しながら4℃で10日間攪拌した後、エチレングリコール（7.0 ml）を加え、一晩攪拌した。反応液を8 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いてpHを7.5に調整した。水素化ホウ素ナトリウム（14 g）を加えて溶解した後、一晩攪拌した。反応液を氷冷し、酢酸でpH 5.5に調整して4℃で1時間攪拌した後、8 M 水酸化ナトリウム水溶液でpH 7.5に調整して溶液1を得た。別に、デキストランT500（10 g, ファルマシア社製, 分子量500K）について、上記の一連の操作を行い、溶液2を得た。さらに、デキストランT250（各10 g, ファルマシア社製, 分子量250K）について、上記の一連の操作を行い、溶液3と溶液4を得た。これらの溶液1～4を合して、バイオマックス-50 膜を用いて限外濾過法により、低分子画分

の除去を行った。高分子画分を凍結乾燥して、デキストランポリアルコール (25 g) を得た。この物質の分子量 (ゲル濾過、プルラン標準) は、163Kであった。

このデキストランポリアルコール (11 g) を、水酸化ナトリウム (46.2 g) を水 (330 ml) に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸 (66 g) を加えて溶解させた後、室温で一晩反応させた。この反応液を酢酸でpHを9に調整した後、バイオマックス-30 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥してカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩 (13 g) を得た。この物質の分子量 (ゲル濾過、プルラン標準) は 228K であり、カルボキシメチル化度は 0.4であった。

このカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩 (600 mg) を水に溶解し、Bio-Rad AG 50W-X2 (200-400 メッシュ、 $H^+$  型) カラム (直径 44mm、長さ210mm) にのせ、水で溶出した。この溶出液にトリエチルアミン (0.93 ml) を加えた後、凍結乾燥して標記化合物 (690 mg) を得た。

#### 例14: 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A' (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951) トリフルオロ酢酸塩の合成

例1で得た3'-N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A' (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951) (79 mg) をトリフルオロ酢酸 (3 ml) に溶かし、1時間放置した。溶媒を留去し、メタノール (30 ml) で共沸を2回、エタノール (30 ml) で共沸を2回行った後、残渣をエーテルで洗浄して、標記化合物 (80 mg) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.53 (d, 1H, J= 8.3Hz), 8.40-8.48 (m, 2H), 8.28 (d, 1H, J= 8.3Hz), 7.95-8.07 (br, 3H), 7.81 (d, 1H, J= 10.2Hz), 7.30-7.37 (m, 2H), 7.15-7.30 (m, 5H), 6.50-6.55 (br, 1H), 5.50-5.57 (m, 1H), 5.41 (d, 2H, J= 7.82Hz), 5.25 (s, 2H), 4.55-4.62 (m, 1H), 3.55-3.92 (m, 6H), 3.15-3.25 (br, 2H), 2.98-3.03 (m, 1H), 2.73-2.82 (m, 1H), 2.40 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.84-1.92 (m, 2H), 0.88 (t, 3H, J= 7.35Hz).

#### 例15: カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951) の合成

例13で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩 (400 mg) をトリエチルアンモニウム塩 (470 mg) に変換し、N,N-ジメチルホルムアミド (30 ml) に溶解させた。この溶液に、例14で得た3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-

A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951) のトリフルオロ酢酸塩 (62 mg) のN,N-ジメチルホルムアミド (5 ml) 溶液、トリエチルアミン (0.02 ml)、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン (470 mg) を順次加え、遮光して室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液の5 mlずつを各10 mlのエタノール中に滴下した。これに3 M 塩化ナトリウム水溶液 (2.5 ml)、ジエチルエーテル (20 ml)を加えて、析出した沈澱を遠心分離により集めた。この沈澱を0.5 M 塩化ナトリウム水溶液に溶解し、氷冷下0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液でpH 9に調整した後、透析膜 (スペクトルポア 1、カットオフ分子量 6000-8000) を用いて、純水に対して透析した。透析内液をミリポアフィルター (0.22 μm) で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物 (600 mg) を得た。本化合物を0.1 M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC (カラム: 東ソー TSK Gel PW-4000XL、溶媒: 0.1 M NaCl、流速: 0.8 ml/min) で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル (0.1 M トリス緩衝液、pH 9.0、0.1 mg/ml) をそれぞれ図6及び図7に示す。本化合物の医薬化合物残基の含量を0.1 M トリス緩衝液 (pH 9.0) 中での 362 nm における吸光度に基づいて定量したところ 5.8% (W/W) であった。

例16: 3'-N-(Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)トリフルオロ酢酸塩の合成

例2で得た3'-N-(Boc-Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951) (79 mg)をトリフルオロ酢酸 (3 ml) に溶かし、1時間放置した。溶媒を留去し、メタノール (30 ml) で共沸を2回、エタノール (30 ml) で共沸を2回行った後、残渣をエーテルで洗浄して、標記化合物 (80 mg) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.62-8.66 (m, 2H), 8.23 (d, 1H, J= 8.3Hz), 8.18-8.20 (m, 1H), 7.98-8.10 (br, 2H), 7.79 (d, 1H, J= 10.7Hz), 7.32 (s, 1H), 7.09 (d, 2H, J= 7.3Hz), 6.93-7.03 (m, 4H), 6.50-6.60 (br, 1H), 5.52-5.55 (m, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.18 (d, 1H, J= 18.5Hz), 4.80 (d, 1H, J= 18.5Hz), 4.57-4.59 (m, 1H), 3.57-3.71 (m, 6H), 3.15-3.25 (m, 2H), 3.00-3.02 (m, 1H), 2.80-2.90 (m, 1H), 2.50 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.86-2.00 (m, 2H), 0.88 (t, 3H, J= 7.35Hz).

例17: カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-A' (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)の合成

例13で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩 (1.

0 g)をトリエチルアンモニウム塩(1.2 g)に変換し、N,N-ジメチルホルムアミド(90 ml)に溶解させた。この溶液に、例16で得た3'-N-(Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951) のトリフルオロ酢酸塩(158 mg)のN,N-ジメチルホルムアミド(15 ml)溶液、トリエチルアミン(0.05 ml)、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(1.2 g)を順次加え、遮光して室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液の5 mlずつを各10 mlのエタノール中に滴下した。これに3 M 塩化ナトリウム水溶液(2.5 ml)、ジエチルエーテル(20 ml)を加えて、析出した沈澱を遠心分離により集めた。この沈澱を0.5 M 塩化ナトリウム水溶液に溶解し、氷冷下0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液でpH 9に調整した後、透析膜(スペクトルポア1、カットオフ分子量 6000-8000)を用いて、純水に対して透析した。透析内液をミリポアフィルター(0.22 μm)で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物(1.4 g)を得た。本化合物の医薬化合物残基の含量を0.1 M トリス緩衝液(pH 9.0)中での362 nmにおける吸光度に基づいて定量したところ5.2% (W/W)であった。

#### 例18: Boc-Gly-Phe-Leu-OHの合成

H-Gly-Phe-Leu-OH (3.0 g)を50%ジオキサン水溶液(48 ml)に加えて氷冷した。この溶液に1 N 水酸化ナトリウム水溶液(9.45 ml)と(Boc)<sub>2</sub>O (2.27 g)を含むジオキサン(24 ml)溶液を加え、1晩攪拌した。反応液に1 N 塩酸(9.45 ml)を加え、溶媒を溜去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液: ジクロロメタン: メタノール=5:1溶液)で精製して標記化合物(2.5 g)を得た。

#### 例19: Boc-Gly-Phe-Leu-Gly-OBzlの合成

例18で得たBoc-Gly-Phe-Leu-OH (2.4 g)およびN-ヒドロキシスクシンイミド(656 mg)をN,N-ジメチルホルムアミド(50 ml)に溶解し、4℃に冷却した後、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(1.17 g)を添加し、2時間攪拌した。この溶液にH-Gly-OBzlのトシル酸塩(1.9 g)とトリエチルアミン(0.79 ml)を溶解したN,N-ジメチルホルムアミド(40 ml)溶液を加えて、室温で16時間攪拌しながら反応させた。この反応液を減圧乾固し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液: ジクロロメタン: メタノール=50:1溶液)で精製して標記化合物(2.0 g)を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-}d_6) \delta$  : 8.20-8.30 (m, 1H), 8.12 (d, 1H,  $J=8.3\text{Hz}$ ), 7.83 (d, 1H,  $J=8.3\text{Hz}$ ), 7.32-7.37 (m, 5H), 6.89-6.95 (m, 1H), 5.12 (s, 1H), 4.52-4.59 (br, 1H), 4.34 (dd, 1H,  $J=7.3\text{Hz}$ ,  $J=15.1\text{Hz}$ ), 3.93 (dd, 1H,  $J=5.5\text{Hz}$ ,  $J=17.2\text{Hz}$ ), 3.84 (dd, 1H,  $J=5.5\text{Hz}$ ,  $J=17.2\text{Hz}$ ), 3.54 (dd, 1H,  $J=5.9\text{Hz}$ ,  $J=16.7\text{Hz}$ ), 3.42 (dd,  $J=5.9\text{Hz}$ ,  $J=16.7\text{Hz}$ ), 3.00 (dd, 1H,  $J=4.4\text{Hz}$ ,  $J=13.7\text{Hz}$ ), 2.78 (dd, 1H,  $J=8.8\text{Hz}$ ,  $J=13.2\text{Hz}$ ), 1.50-1.65 (m, 1H), 1.45 (t, 2H,  $J=7.3\text{Hz}$ ), 1.36 (s, 9H), 0.86 (d, 3H,  $J=6.4\text{Hz}$ ), 0.82 (d, 3H,  $J=6.4\text{Hz}$ ).

例20 : Boc-Gly-Phe-Leu-Gly-OHの合成

例19で得たBoc-Gly-Phe-Leu-OBzl(1.7 g) を酢酸エチル(30 ml) とメタノール(30 ml) の混合溶液に溶解させた後、5 % Pd-C (1.5 g)を加え、接触還元を行った。反応液を濾過し、濾液を減圧乾固して、標記化合物 (1.15 g) を得た。

例21 : 3'-N-(Boc-Gly-Phe-Leu-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)の合成

例20で得たBoc-Gly-Phe-Leu-Gly-OH (200 mg) およびN-ヒドロキシスクシンイミド(58 mg) をN,N-ジメチルホルムアミド (5 ml) に溶解し、4 °Cに冷却した後、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (104 mg) を加えて溶解させた。この溶液に DX-8951 のメタンスルホン酸塩 (224 mg) とトリエチルアミン (0.059 ml) を溶解したN,N-ジメチルホルムアミド (5 ml) 溶液を加えて、遮光下に室温で16時間攪拌しながら反応させた。この反応液を減圧乾固し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液 : 0.5 % 酢酸を含むジクロロメタン : メタノール=10 : 1 溶液) で精製して標記化合物 (200 mg) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-}d_6) \delta$  : 8.35 (d, 1H,  $J=7.8\text{Hz}$ ), 8.08-8.18 (m, 2H), 7.75-7.85 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 7.10 (d, 2H,  $J=6.8\text{Hz}$ ), 7.08-7.13 (m, 3H), 6.85-6.95 (br, 1H), 6.40-6.65 (br, 1H), 5.52-5.55 (m, 1H), 5.46 (d, 1H,  $J=18.5\text{Hz}$ ), 5.37(d, 1H,  $J=18.5\text{Hz}$ ), 5.24 (s, 2H), 4.44-4.52 (m, 1H), 4.15-4.25 (m, 1H), 3.68-3.72 (m, 2H), 3.40-3.52 (m, 2H), 3.15-3.25 (br, 2H), 2.85-2.95 (m, 1H), 2.65-2.75 (m, 1H), 2.40 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.80-1.91 (m, 2H), 1.50-1.65 (m, 1H), 1.45 (t, 2H,  $J=7.3\text{Hz}$ ), 1.35 (s, 9H), 0.88 (t, 3H,  $J=7.4$ ), 0.86 (d, 3H,  $J=6.4\text{Hz}$ ), 0.82 (d, 3H,  $J=6.4\text{Hz}$ ).

例22 : 3'-N-(Gly-Phe-Leu-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)トリフルオロ酢酸塩の合成

例21で得た3'-N-(Boc-Gly-Phe-Leu-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951) (97 mg)をトリフルオロ酢酸 (3 ml) に溶かし、1時間放置した。溶媒を留去し、メタノール(30 ml) で共沸を2回、エタノール(30 ml) で共沸を2回行った後、残渣をエーテルで洗浄して、標記化合物(95 mg) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ : 8.57 (d, 1H, J=8.3Hz), 8.47 (d, 1H, J=8.3Hz), 8.32 (d, 1H, J=7.8Hz), 8.17 (t, 1H, J=5.5Hz), 7.81-7.91 (br, 3H), 7.79 (d, 1H, J=10.7Hz), 7.32 (s, 1H), 7.21-7.23 (m, 5H), 7.12-7.17 (m, 1H), 6.45-6.55 (br, 1H), 5.57 (q, 1H, J=4.4Hz), 5.43 (d, 1H, J=16.1Hz), 5.34 (d, 1H, J=16.1Hz), 5.23 (s, 2H), 4.67 (dt, 1H, J=4.0Hz, J=9.0Hz), 4.31 (dd, 1H, J=8.5Hz, J=15.0Hz), 4.0-4.4 (br, 1H), 3.74-3.76 (m, 2H), 3.56 (dd, 1H, J=6.0Hz, J=16.0Hz), 3.41 (dd, 1H, J=6.0Hz, J=16.0Hz), 3.17-3.19 (br, 2H), 3.02 (dd, 1H, J=4.0Hz, J=14.0Hz), 2.70 (dd, 1H, J=10.0Hz, J=14.0Hz), 2.40 (s, 3H), 2.05-2.15 (m, 1H), 1.85 (dt, 2H, J=7.0Hz, J=14.0Hz), 1.50-1.55 (m, 1H), 1.45 (t, 2H, J=6.0Hz), 1.35 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, J=7.4), 0.85 (d, 3H, J=6.4Hz), 0.80 (d, 3H, J=6.4Hz).

例23: カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Phe-Leu-Gly-NH-A' (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)の合成

例13で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩 (690 mg) をN,N-ジメチルホルムアミド(50 ml) に溶解させた。この溶液に、例22で得た3'-N-(Gly-Phe-Leu-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951) のトリフルオロ酢酸塩 (95 mg)のN,N-ジメチルホルムアミド(10 ml) 溶液、トリエチルアミン(0.03 ml)、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン (690 mg) を順次加え、室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液の5 mlずつを各10 ml のエタノール中に滴下した。これに3 M 塩化ナトリウム水溶液 (2.5 ml)、ジエチルエーテル(20 ml) を加えて、析出した沈澱を遠心分離により集めた。この沈澱を0.5 M 食塩水に溶解し、氷冷下0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で pH 9 に調整した後、透析膜 (スペクトルポア1、カットオフ分子量 6000-8000) を用いて、純水に対して透析した。透析内液をミリポアフィルター (0.22 μm) で濾過した後、濾液を凍結乾燥して標記化合物 (600 mg) を得た。本化合物の医薬化合物残基の含量を0.1 M トリス緩衝液 (pH 9.0) 中での 362 nm における吸光度に基づい

て定量したところ、4.8% (W/W) であった。

例24：カルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩の合成

デキストランT500 (50 g, ファルマシア社製, 分子量 500K) を0.1 M 酢酸緩衝液 (pH5.5, 5000 ml) に溶解し、過ヨウ素酸ナトリウム(165.0 g) の水溶液(5000 ml) を加えた。遮光しながら4℃で10日間攪拌した後、エチレングリコール(35.0 ml) を加え、一晩攪拌した。反応液を8 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH 7.5 に調整した。水素化ホウ素ナトリウム (70 g) を加えて溶解した後、一晩攪拌した。反応液を氷冷し、酢酸で pH 5.5 に調整して4℃で1時間攪拌した後、8 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH 7.5 に調整した。得られた水溶液をバイオマックス-50 膜を用いて限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。高分子画分を凍結乾燥して、デキストランポリアルコール (27.1 g) を得た。この物質の分子量 (ゲル濾過、プルラン標準) は、140Kであった。

このデキストランポリアルコール(5 g) を、水酸化ナトリウム (21 g) を水 (150 ml) に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸 (30 g) を加えて溶解させた後、室温で一晩反応させた。この反応液を酢酸でpHを8に調整した後、バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥してカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(5.6 g) を得た。この物質の分子量 (ゲル濾過、プルラン標準) は 263K であり、カルボキシメチル化度は0.4 であった。

このカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(2.0 g) を水に溶解し、Bio-Rad AG 50W-X2 (200-400 メッシュ、 $H^+$  型) カラム (直径 44 mm、長さ 210 mm) にのせ、水で溶出した。この溶出液にトリエチルアミン (4 ml) を加えた後、凍結乾燥して標記化合物(2.2 g) を得た。

例25：カルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリメチルアンモニウム塩の合成

例24で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(1.0 g) を水に溶解し、Bio-Rad AG 50W-X2 (200-400 メッシュ、 $Me_3N H^+$  型) カラムにのせ、水で溶出した。この溶出液を凍結乾燥して標記化合物 (950 mg) を得た。

例26 : 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)塩酸塩の合成

例14と同様の方法で3'-N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951) (400 mg) から得た3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A トリフルオロ酢酸塩を水-MeOH (1:4) に溶解して、Bio-Rad AG 1-X8 (200-400 メッシュ、Cl<sup>-</sup> 型) カラム (1.5 cm × 8.6 cm) にのせ、上記溶媒で溶出した。この溶出液を濃縮した後、凍結乾燥して標記化合物 (310 mg) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ : 8.53 (d, 1H, J=8.5Hz), 8.46-8.48 (m, 1H), 8.37-8.39 (m, 1H), 7.95 (d, 1H, J=8.0Hz), 7.80 (s, 3H), 7.78 (d, 1H, J=11.1Hz), 7.34 (s, 1H), 7.14-7.24 (m, 5H), 6.50 (s, 1H), 5.56-5.60 (m, 1H), 5.35-5.40 (m, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.51-4.56 (m, 1H), 3.86 (dd, J=4.8, 13.5Hz, 1H), 3.68-3.79 (m, 3H), 3.54 (s, 2H), 3.15-3.22 (m, 2H), 3.01 (dd, J=5.6, 13.5Hz, 1H), 2.78 (dd, J=9.6, 3.5Hz, 1H), 2.41 (s, 3H), 2.12-2.23 (m, 2H), 1.81-1.89 (m, 2H), 0.88 (t, 3H, J=7.2Hz).

Mass (FAB); m/e 753 (M+1)

例27 : カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A'-NH<sub>2</sub> =DX-8951)の合成

例25で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリメチルアンモニウム塩(0.1 g) をN,N-ジメチルホルムアミド (6 ml) に溶解させた。この溶液に、例26で得た 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951) の塩酸塩 (24 mg) のN,N-ジメチルホルムアミド(10 ml) 溶液、トリエチルアミン(5 μl)、1-エトキシカルボニル-2- エトキシ-1,2- ジヒドロキシキノリン(0.1 g) を順次加え、室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液の5 mlずつを各10 ml のエタノール中に滴下した。これに3 M 塩化ナトリウム水溶液 (2.5 ml) 、ジエチルエーテル(20 ml) を加えて、析出した沈澱を遠心分離 (3500 rpm, 8分) により集めた。この沈澱を0.5 M 食塩水に溶解し、氷冷下0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で pH 9 とした。得られた水溶液をバイオマックス-30 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22 μm)で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物(90 mg) を得た。本化合物の医薬化合物残基の含量を0.1 M トリス緩衝液 (pH 9.0) 中での 362 nm における吸光度に基づいて定量したところ 11% (W/

W)であった。

例28：カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A'(A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)の合成

例25で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリメチルアンモニウム塩(0.1 g)をN,N-ジメチルホルムアミド(6 ml)に溶解させた。この溶液に、例26で得た3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A'(A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)の塩酸塩(36 mg)のN,N-ジメチルホルムアミド(10 ml)溶液、トリエチルアミン(8 μl)、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(0.1 g)を順次加え、室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液の5 mlずつを各10 mlのエタノール中に滴下した。これに3M塩化ナトリウム水溶液(2.5 ml)、ジエチルエーテル(20 ml)を加えて、析出した沈澱を遠心分離(3500 rpm, 8分)により集めた。この沈澱を0.5 M食塩水に溶解し、氷冷下0.1 M水酸化ナトリウム水溶液でpH 12とした。得られた水溶液をバイオマックス-30膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22 μm)で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物(80 mg)を得た。本化合物を0.1 M塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC(カラム：東ソー TSK Gel PW-4000XL、溶媒：0.1M NaCl、流速：0.8 ml/min)で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(0.1 M トリス緩衝液、pH 9.0、36 μg/ml)をそれぞれ図8及び図9に示す。本化合物の医薬化合物基の含量を0.1 M トリス緩衝液(pH 9.0)中での362 nmにおける吸光度に基づいて定量したところ15% (W/W)であった。

例29：カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-A'(A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)の合成

デキストランT250(20 g, EXTRASYNTHESE製、平均分子量 250K)を0.1 M 酢酸緩衝液(pH5.5, 2000 ml)に溶解し、過ヨウ素酸ナトリウム(66.0 g)の水溶液(2000 ml)を加えた。遮光しながら4℃で10日間攪拌した後、エチレングリコール(14.0 ml)を加え、一晩攪拌した。反応液を氷冷下で8 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いてpHを7.5に調整した。水素化ホウ素ナトリウム(28 g)を加えて溶解した後、室温で一晩攪拌した。反応液を氷冷し、酢酸でpH 5.5に調整して4℃で1時間攪拌した後、氷冷下で8 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いてpHを7.5に調整した。得

られた水溶液をバイオマックス-30 膜を用いた限外濾過法により低分子画分を除去して、膜を通過しない残留溶液 1 を得た。別に、デキストラン T250 (50 g, EXTRASYNTHESSE 製, 平均分子量 250K) を 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5, 5000 ml) に溶解し、過ヨウ素酸ナトリウム (165 g) の水溶液 (5000 ml) を加えた。遮光しながら 4 °C で 10 日間攪拌した後、エチレングリコール (35.0 ml) を加え、一晩攪拌した。反応液を氷冷下で 8 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 7.5 に調整した。水素化ホウ素ナトリウム (70 g) を加えて溶解した後、室温で一晩攪拌した。反応液を氷冷し、酢酸で pH 5.5 に調整して 4 °C で 1 時間攪拌した後、氷冷下で 8 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 7.5 に調整した。得られた水溶液をバイオマックス-30 膜を用いた限外濾過法により低分子画分を除去して、膜を通過しない残留溶液 2 を得た。残留溶液 1 と残留溶液 2 を合して、限外濾過法によりバイオマックス-50 膜を通過する画分をバイオマックス-30 膜を用いて低分子画分を除去し、凍結乾燥してデキストランポリアルコール (25.7 g) を得た。この物質の分子量 (ゲル濾過、プルラン標準) は、47K であった。

このデキストランポリアルコール (5 g) を、水酸化ナトリウム (35 g) を水 (150 ml) に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸 (50 g) を加えて溶解させた後、室温で 18 時間反応させた。この反応液を酢酸で pH を 8 に調整した後、バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥して、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩 (7.2 g) を得た。この物質の分子量 (ゲル濾過、プルラン標準) は 127K であり、カルボキシメチル化度は 0.8 であった。このカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩 (2.2 g) を水に溶解し、Bio-Rad AG 50W-X2 (200-400 メッシュ、 $H^+$  型) カラム (直径 44 mm、長さ 210 mm) にのせ、水で溶出した。この溶出液にトリエチルアミン (4 ml) を加えた後、凍結乾燥してカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩 (2.69 g) を得た。

このカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩 (2.67 g) を N,N-ジメチルホルムアミド (200 ml) に溶解した。この溶液に、例 2 と同様に合成した 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A ( $A-NH_2 = DX-8951$ ) (350

mg) から例16と同様の方法で脱Boc 化して得られる3'-N-(Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A のトリフルオロ酢酸塩とトリエチルアミン (0.116 ml) をN,N-ジメチルホルムアミド (10 ml) に溶かして得られる溶液、1-エトキシカルボニル-2- エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン (2.67 g) をN,N-ジメチルホルムアミド (10 ml) に溶かして得られる溶液を順次加え、室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液に3 M 塩化ナトリウム水溶液 (100 ml) を加え、8 ml ずつを各30 ml のエタノール中に滴下した。それぞれに3 M 塩化ナトリウム水溶液 (1 ml)、ジエチルエーテル (5 ml) を加えて、析出した沈澱を遠心分離 (3500 rpm, 8分) により集めた。この沈澱をアセトンで洗浄した後、水に溶解し、3 M 塩化ナトリウム水溶液 (10 ml) を加えた後、0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で pH 9 に調整し、37℃で1時間処理した。この処理液をバイオマックス-10 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター (0.22  $\mu$ m) で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物 (2.30 g) を得た。本化合物を0.1 M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC (カラム: 東ソー TSK Gel PW-4000XL、溶媒: 0.1M NaCl、流速: 0.8 ml/min) で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル (0.1 M トリス緩衝液, pH 9.0, 0.20 mg/ml) をそれぞれ図10及び図11に示す。本化合物の医薬化合物残基の含量を0.1 M トリス緩衝液 (pH 9.0) 中での 362 nm における吸光度に基づいて定量したところ、5.8% (W/W) であった。

例30: カルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩の合成

デキストランT10 (20 g, ファルマシア社製、平均分子量10K) の0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 溶液 (2000 ml) に、過ヨウ素酸ナトリウム (66.0 g) の水溶液 (2000 ml) を加えた。遮光しながら4℃で10日間攪拌した後、エチレングリコール (14.0 ml) を加え、一晩攪拌した。反応液を氷冷下で8 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH 7.5 に調整した。水素化ホウ素ナトリウム (28 g) を加えて溶解した後、室温で一晩攪拌した。反応液を氷冷し、酢酸で pH 5.5 に調整して4℃で1時間攪拌した後、氷冷下で8 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH 7.5 に調整した。得られた水溶液をバイオマックス-5膜 (ミリポア社製) を用いた限外濾過法により低分子画分を除去して、膜を通過しない残留溶液をバイオマックス-30 膜を通過させ

た。得られた通過液を凍結乾燥して、デキストランポリアルコール(8.0 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、13Kであった。

このデキストランポリアルコール(3.7 g)を、水酸化ナトリウム(25.9 g)を水(111 ml)に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸(37 g)を加えて溶解させた後、室温で20時間反応させた。この反応液を酢酸で pH 8 に調整した後、バイオマックス-5膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥して、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(6.2 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、37K であり、カルボキシメチル化度は0.9 であった。

このカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(6.0 g)を水に溶解し、Bio-Rad AG 50W-X2 (200-400 メッシュ、 $H^+$  型)カラムにのせ、水で溶出した。この溶出液にトリエチルアミン(9.3 ml)を加えた後、凍結乾燥して標記化合物(7.2 g)を得た。

#### 例31：カルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩の合成

例30で得たデキストランポリアルコール(3.9 g)を、水酸化ナトリウム(16.3 g)を水(117 ml)に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸(23.4 g)を加えて溶解させた後、室温で18時間反応させた。この反応液を酢酸で pH 8 に調整した後、バイオマックス-5膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥して、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(5.0 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、28K であり、カルボキシメチル化度は0.5 であった。このカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(4.8 g)を例30と同様にトリエチルアンモニウム塩に変換して、標記化合物(5.6 g)を得た。

#### 例32：カルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩の合成

デキストラン4(20 g、フナコシ社製、平均分子量 4K-6K)の0.1 M 酢酸緩衝液(pH 5.5)溶液(2000 ml)に、過ヨウ素酸ナトリウム(66.0 g)の水溶液(2000

ml) を加えた。遮光しながら 4℃ で 10 日間攪拌した後、エチレングリコール (14.0 ml) を加え、一晩攪拌した。反応液を氷冷下で 8 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 7.5 に調整した。水素化ホウ素ナトリウム (28 g) を加えて溶解した後、室温で一晩攪拌した。反応液を氷冷し、酢酸で pH 5.5 に調整して 4℃ で 1 時間攪拌した後、氷冷下で 8 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH 7.5 に調整した。得られた水溶液をバイオマックス-3 膜 (ミリポア社製) を用いた限外濾過法により低分子画分を除去した。得られた通過液を凍結乾燥してデキストランポリアルコール (6.0 g) を得た。この物質の分子量 (ゲル濾過、プルラン標準) は、9K であった。このデキストランポリアルコール (2.7 g) を、水酸化ナトリウム (18.9 g) を水 (81 ml) に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸 (27 g) を加えて溶解させた後、室温で 20 時間反応させた。この反応液を酢酸で pH 8 に調整した後、バイオマックス-5 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥して、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩 (4.2 g) を得た。この物質の分子量 (ゲル濾過、プルラン標準) は、20K であり、カルボキシメチル化度は 0.9 であった。

このカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩 (4.0 g) を例 30 と同様にトリエチルアンモニウム塩に変換して、標記化合物 (4.8 g) を得た。

#### 例 33 : カルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩の合成

例 32 で得たデキストランポリアルコール (2.7 g) を、水酸化ナトリウム (11.3 g) を水 (81 ml) に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸 (16.2 g) を加えて溶解させた後、室温で 18 時間反応させた。この反応液を酢酸で pH 8 に調整した後、バイオマックス-5 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥して、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩 (2.7 g) を得た。この物質の分子量 (ゲル濾過、プルラン標準) は、16K であり、カルボキシメチル化度は 0.5 であった。このカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩 (2.7 g) を例 30 と同様にトリエチルアンモニウム塩に変換して、標記化合物 (3.1 g) を得た。

例34：カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A'(A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)の合成

例30で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(1.5 g) N,N-ジメチルホルムアミド(90 ml) 溶解させた。この溶液に、トリエチルアミン(0.07 ml) と3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)のトリフルオロ酢酸塩 (210 mg) のN,N-ジメチルホルムアミド(40 ml) 溶液、1-エトキシカルボニル-2- エトキシ-1,2- ジヒドロキシキノリン(1.5 g) を順次加え、室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液の5 mlずつを各10 ml のエタノール中に滴下した。それぞれに3 M 塩化ナトリウム水溶液 (2.5 ml)、ジエチルエーテル(20 ml)を加えて、析出した沈澱を遠心分離 (3500 rpm, 8分) により集めた。この沈澱を0.5 M 食塩水に溶解し、氷冷下0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で pH 9 とした。得られた水溶液をバイオマックス-3膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22 μm)で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物(1.3 g)を得た。本化合物を0.1 M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC (カラム：東ソー TSK Gel PW-4000XL、溶媒： 0.1M NaCl、流速： 0.8 ml/min) で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル (0.1 M トリス緩衝液、pH 9.0、 65 μg/ml) をそれぞれ図12及び図13に示す。本化合物の医薬化合物残基の含量を0.1 M トリス緩衝液 (pH 9.0) 中での 362 nm における吸光度に基づいて定量したところ 6.4% (W/W) であった。

例35：カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A'(A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)の合成

例31で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(1.2 g) をN,N-ジメチルホルムアミド(90 ml) 溶解させた。この溶液に、トリエチルアミン (0.056 ml) と3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951) のトリフルオロ酢酸塩 (168 mg) のN,N-ジメチルホルムアミド(30 ml) 溶液、1-エトキシカルボニル-2- エトキシ-1,2- ジヒドロキシキノリン(1.2 g) を順次加え、室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液の5 mlずつを各10 ml のエタノール中に滴下した。それぞれに3 M 塩化ナトリウム水溶液 (2.5 ml)、ジエチルエーテル(20 ml)を加えて、析出した沈澱を遠心分離 (3500 rpm, 8分) により集

めた。この沈澱を0.5 M 食塩水に溶解し、氷冷下0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で pH 9 とした。得られた水溶液をバイオマックス-3膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22  $\mu\text{m}$ )で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物(1.0 g)を得た。本化合物の医薬化合物残基の含量を0.1 M トリス緩衝液(pH 9.0)中での 362 nm における吸光度に基づいて定量したところ、4.8% (W/W) であった。

例36: カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A'(A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)の合成

例32で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(1.2 g)をN,N-ジメチルホルムアミド(90 ml)溶解させた。この溶液に、トリエチルアミン(0.056 ml)と3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A'(A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)のトリフルオロ酢酸塩(168 mg)のN,N-ジメチルホルムアミド(30 ml)溶液、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(1.2 g)を順次加え、室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液の5 mlずつを各10 mlのエタノール中に滴下した。それぞれに3 M 塩化ナトリウム水溶液(2.5 ml)、ジエチルエーテル(20 ml)を加えて、析出した沈澱を遠心分離(3500 rpm, 8分)により集めた。この沈澱を0.5 M 食塩水に溶解し、氷冷下0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で pH 9 とした。得られた水溶液をバイオマックス-3膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22  $\mu\text{m}$ )で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物(1.0 g)を得た。本化合物の医薬化合物残基の含量を0.1 M トリス緩衝液(pH 9.0)中での 362 nm における吸光度に基づいて定量したところ、5.9% (W/W) であった。

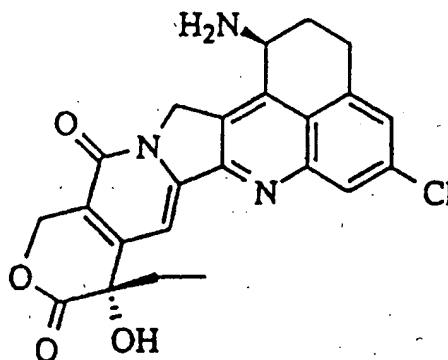
例37: カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A'(A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)の合成

例33で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(1.5 g)をN,N-ジメチルホルムアミド(90 ml)溶解させた。この溶液に、トリエチルアミン(0.07 ml)と3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A'(A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)のトリフルオロ酢酸塩(210 mg)のN,N-ジメチルホルムアミド(40 ml)溶液、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(1.5 g)を順次加え、

室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液の5 mlずつを各10 mlのエタノール中に滴下した。それぞれに3 M 塩化ナトリウム水溶液 (2.5 ml)、ジエチルエーテル(20 ml)を加えて、析出した沈澱を遠心分離 (3500 rpm, 8分) により集めた。この沈澱を0.5 M 食塩水に溶解し、氷冷下0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で pH 9 とした。得られた水溶液をバイオマックス-3膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22  $\mu$ m)で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物(1.3 g)を得た。本化合物の医薬化合物残基の含量を0.1 M トリス緩衝液 (pH 9.0) 中での 362 nm における吸光度に基づいて定量したところ、4.6% (W/W) であった。

例38: Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DW-8286) の合成

Boc-Gly-Gly-Phe-Gly (42 mg) およびN-ヒドロキシスクシンイミド(12 mg)をN,N-ジメチルホルムアミド (2 ml) に溶解し、4 °Cに冷却した後、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(22 mg)を添加した。この溶液に下記式:



で表される化合物 [(1s, 9s)-1-アミノ-5-クロロ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-1H, 12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン: DW-8286]の塩酸塩(50 mg)とトリエチルアミン(0.01 ml)を溶解したN,N-ジメチルホルムアミド (6 ml) 溶液を加えて、遮光して、室温で16時間攪拌しながら反応させた。この反応液を減圧乾固し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液: 0.5% 酢酸を含むジクロロメタン: メタノール=10:1 溶液) で精製して標記化合物(27 mg)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.10-8.20 (br, 1H), 7.95-8.05 (br, 1H), 7.70-7.80 (br, 2H), 7.50-7.60 (br, 1H), 7.40-7.50 (br, 1H), 7.10-7.25 (m, 5H), 7.05-7.15 (br, 1H),

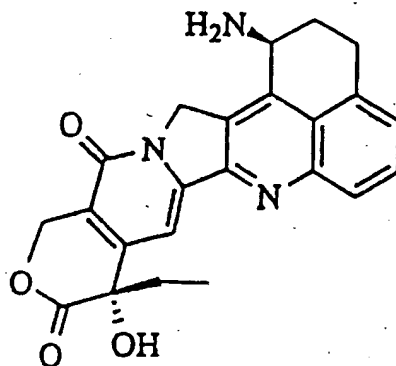
5.85-5.95 (br, 1H), 5.50-5.60 (br, 1H), 5.40-5.50 (m, 1H), 5.25-5.35 (m, 1H), 5.05-5.15 (m, 1H), 4.90-5.00 (m, 1H), 4.70-4.80 (br, 1H), 4.10-4.25 (br, 2H), 3.60-3.90 (m, 4H), 3.10-3.40 (m, 3H), 2.95-3.05 (br, 1H), 2.15-2.30 (br, 1H), 1.75-1.90 (br, 2H), 1.39 (s, 9H), 0.80-1.00 (m, 3H).

例39 : カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH<sub>2</sub> =DW-8286)の合成

例24で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩 (175 mg) をN,N-ジメチルホルムアミド(20 ml) に溶解させた。この溶液に、例38で得られた3'-N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DW-8286) (27 mg) から例4と同様の方法で脱Boc化して得られる 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-Aのトリフルオロ酢酸塩(29 mg) とトリエチルアミン(9  $\mu$ l)のN,N-ジメチルホルムアミド (5 ml) 溶液、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン (175 mg) を順次加え、室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液の5 mlずつを各10 ml のエタノール中に滴下した。これに3 M 塩化ナトリウム水溶液 (2.5 ml) 、ジエチルエーテル(20 ml) を加えて、析出した沈澱を遠心分離 (3500 rpm, 8 分) により集めた。この沈澱を0.5 M 食塩水に溶解し、氷冷下0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で pH 9 とした。得られた水溶液をバイオマックス-30 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22  $\mu$ m) で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物 (135 mg) を得た。本化合物を0.1 M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC (カラム : 東ソー TSK Gel PW-4000XL、溶媒 : 0.1M NaCl、流速 : 0.8 ml/min) で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル (0.1 M トリス緩衝液、Ph 9.0、99  $\mu$ g/ml) をそれぞれ図14及び図15 に示す。本化合物の医薬化合物残基の含量は、0.1 M トリス緩衝液 (pH 9.0) 中での 362 nm における吸光度に基づいて定量したところ、6.1% (W/W) であった。

例40 : 3'-N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DW-8089)の合成

Boc-Gly-Gly-Phe-Gly (163 mg) およびN-ヒドロキシスクシンイミド(45 mg) をN,N-ジメチルホルムアミド(10 ml) に溶解し、4 °Cに冷却した後、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(79 mg) を添加した。この溶液に下記の式 :



で表される化合物 [(1s, 9s)-1-アミノ-9-エチル-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン: DW-8089]のトリシル酸塩 (170 mg) とトリエチルアミン (0.054 ml) を溶解したN,N-ジメチルホルムアミド(30 ml) 溶液を加えて、遮光下に室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液を減圧乾固し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液: 0.5%酢酸を含むジクロロメタン: メタノール=94:6 溶液) で精製して標記化合物 (100 mg) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8.51 (d, 1H,  $J=8.5\text{Hz}$ ), 8.41 (t, 1H,  $J=5.6\text{Hz}$ ), 8.29 (s, 1H), 8.17 (d, 1H,  $J=8.0\text{Hz}$ ), 8.03 (d, 1H,  $J=8.0\text{Hz}$ ), 7.90 (dd, 1H,  $J=4.8, 5.6\text{Hz}$ ), 7.79 (t, 1H,  $J=5.6\text{Hz}$ ), 7.53 (d, 1H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 7.36 (s, 1H), 7.13-7.25 (m, 5H), 6.94-6.95 (m, 1H), 5.60-5.63 (m, 1H), 5.36-5.47 (m, 2H), 5.21-5.30 (m, 2H), 4.42-4.47 (m, 1H), 3.63-3.96 (m, 3H), 3.51-3.59 (m, 3H), 3.31-3.40 (m, 1H), 3.09-3.21 (m, 1H), 3.02 (dd, 1H,  $J=4.8, 13.5\text{Hz}$ ), 2.76-2.81 (m, 1H), 2.13-2.17 (m, 2H), 1.85-1.90 (m, 2H), 1.37 (s, 9H), 0.89 (t, 3H,  $J=8.0\text{Hz}$ ).

Mass (FAB);  $m/e$  822 ( $M+1$ ).

例41: カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A' (A-NH<sub>2</sub> =DW-8089)の合成

例24で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(1.6 g) をN,N-ジメチルホルムアミド(60 ml) に溶解させた。この溶液に、例40で得られた3'-N-(Boc-Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DW-8089) (200 mg) から例4と同様の方法で脱Boc化して得られる3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-NH-Aのトリフルオロ酢酸塩とトリエチルアミン(0.07 ml) をN,N-ジメチルホルムアミド(20

ml) に溶かして得られる溶液、1-エトキシカルボニル-2- エトキシ-1, 2-ジヒドロキシキノリン(1.6 g) を順次加え、室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液の5 mlずつを各10 ml のエタノール中に滴下した。それぞれに3 M 塩化ナトリウム水溶液 (2.5 ml)、ジエチルエーテル(25 ml) を加えて、析出した沈澱を遠心分離 (2500 rpm, 8分) により集めた。この沈澱をエタノールで洗浄した後、水に溶解し、3 M 塩化ナトリウム水溶液(20 ml) を加え、0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で pH 9 に調整した。この溶液をバイオマックス-10 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22  $\mu$ m)で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物 (1.20 g) を得た。本化合物を0.1 M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC (カラム：東ソー TSK Gel PW-4000XL、溶媒：0.1 M NaCl、流速：0.8 ml/min) で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル (0.1 M トリス緩衝液, pH 9.0, 0.26 mg/ml) をそれぞれ図16及び図17に示す。本化合物の医薬化合物残基の含量を0.1 M トリス緩衝液 (pH 9.0) 中での 362 nm における吸光度に基づいて定量したところ、5.0% (W/W) であった。

#### 例42: Trt-Gly-Gly-Phe-Gly-OHの合成

Trt-Gly-Gly-Phe-Gly-OBzl (670 mg)、10% Pd-C (100mg)およびギ酸アンモニウム (200 mg) をDMF (5 ml)中に加え、3時間攪拌した。反応液を濾過し、濾液を減圧乾固した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液：ジクロロメタン：メタノール= 8 : 1 溶液) で精製して標記化合物 (300 mg) を得た。  
 $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$   $\delta$  : 7.16-7.45 (m, 20H), 4.66 (dd, 1H, J=9.8, 5.4Hz), 3.93 (d, 1H, J=16.6Hz), 3.80 (d, 1H, J=17.6Hz), 3.78 (d, 1H, J=16.6Hz), 3.68 (d, 1H, J=17.1Hz), 3.23 (dd, 1H, J=14.2, 5.4Hz), 2.90 (d, 1H, J=13.7Hz), 2.90 (s, 1H).

#### 例43: 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DXR塩酸塩の合成

Trt-Gly-Gly-Phe-Gly-OH (100 mg) およびN-ヒドロキシスクシンイミド(22 mg) をDMF (4 ml)に溶かし、氷冷下N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(40 mg) を加え4℃で2時間攪拌した。この溶液にN-メチルモルホリン (0.019 ml) とドキシソルビシン(DXR) 塩酸塩(92 mg) を溶解したDMF (20 ml) 溶液を加えて、4℃で16時間攪拌した。この反応液を減圧乾固し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液：ジクロロメタン：メタノール= 20 : 1 溶液) で精製した。得

られた化合物を 75%酢酸 1 ml に溶解し、1 時間攪拌した。水 (20 ml)を加えて析出した固体を濾過して除き、濾液を凍結乾燥して、得られた粉末を水 (5 ml) に溶かした。この溶液をAG-1X8 (Cl<sup>-</sup> 型) カラムに通し、水で溶出した後、ジクロロメタンで洗い、水層を凍結乾燥して、標記化合物(40 mg) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR(CD<sub>3</sub>OD) δ : 7.95 (d, 1H, J=7.3Hz), 7.82 (t, 1H, J=7.8Hz), 7.54 (d, 1H, J=8.3Hz), 7.16-7.26 (m, 5H), 5.43 (d, 1H, J=3.4Hz), 5.14 (br, 1H), 4.72 (s, 2H), 4.42 (dd, 1H, J=8.3, 6.8Hz), 4.30 (q, 1H, J=6.8Hz), 4.14-4.18 (m, 1H), 4.03 (d, 1H, J=16.6Hz), 4.02 (s, 3H), 3.86 (d, 1H, J=18.5Hz), 3.83 (d, 1H, J=17.1Hz), 3.75 (d, 1H, J=16.1Hz), 3.73 (d, 1H, J=16.1Hz), 3.62 (br, 1H), 3.58 (d, 1H, J=16.6Hz), 3.10-3.15 (m, 2H), 3.00 (d, 1H, J=18.6Hz), 2.94 (dd, 1H, J=14.2, 8.8Hz), 2.38 (d, 1H, J=14.2Hz), 2.18 (dd, 1H, J=14.2, 4.4Hz), 1.94-2.00 (m, 1H), 1.71 (dd, 1H, J=12.7, 4.4Hz), 1.28 (d, 3H, J=6.3Hz).

例44 : カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DXRの合成

例24で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(1.5 g) を例25と同様の方法でトリメチルアンモニウム塩(1.2 g) に変換した後、この 400 mg をN,N-ジメチルホルムアミド(24 ml) に溶解させた。この溶液に、3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DXRの塩酸塩(76 mg) のN,N-ジメチルホルムアミド(24 ml) 溶液、トリエチルアミン(24 μl)、1-エトキシカルボニル-2- エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン (400 mg) を順次加え、室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液の5 mlずつを各10 ml のエタノール中に滴下した。これに3 M 塩化ナトリウム水溶液 (2.5 ml)、ジエチルエーテル(20 ml) を加えて、析出した沈澱を遠心分離 (3500 rpm, 8分) により集めた。この沈澱を0.5 M 食塩水に溶解し、バイオマックス-30 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22 μm)で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物(40 mg) を得た。本化合物を0.1 M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC (カラム: 東ソー TSK Gel PW-4000XL、溶媒: 0.1M NaCl、流速: 0.8 ml/min) で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル (0.01 Mトリス緩衝液、pH 7.4、36 μg/ml) をそれぞれ図18及び図19に示す。本化合物の医薬化合物残基の含量は、PBS (pH 7.4)中での 480 nm における吸光度に基づいて定量したところ、6.0% (W/W)

であった。

例45：カルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩の合成

デキストランT150 (20 g、ファルマシア社製、平均分子量 150K) を0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5、2000 ml) に溶解し、過ヨウ素酸ナトリウム (66.0 g) の水溶液 (2000 ml) を加えた。遮光しながら4℃で10日間攪拌した後、エチレングリコール (14.0 ml) を加え、一晩攪拌した。反応液を氷冷下で8 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いてpHを7.5 に調整した。水素化ホウ素ナトリウム (28 g) を加えて溶解した後、室温で一晩攪拌した。反応液を氷冷して、酢酸で pH 5.5 に調整し、4℃で1時間攪拌した。氷冷下で8 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いてpHを7.5 に調整した。得られた水溶液をバイオマックス-5膜 (ミリポア社製) を用いた限外濾過法により、500 mlまで濃縮して溶液1を得た。別に、デキストランT110 (20 g) について上記の一連の操作を行い、溶液2を得た。溶液1と溶液2を混合し、混合溶液のpHを3.0 とし、40℃で4時間インキュベートした後、pHを7に調整して低分子化されたデキストランポリアルコールを含む溶液を得た。バイオマックス-30 膜を通過させ、次いでバイオマックス-5膜を用いて脱塩した後、凍結乾燥してデキストランポリアルコール (4.6 g) を得た。この物質の分子量 (ゲル濾過、プルラン標準) は、17Kであった。

このデキストランポリアルコール (2.5 g) を、水酸化ナトリウム (17.5 g) を水 (75 ml) に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸 (25 g) を加えて溶解させた後、室温で20時間反応させた。この反応液を酢酸でpHを9に調整した後、バイオマックス-5膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥して、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩 (4.0 g) を得た。この物質の分子量 (ゲル濾過、プルラン標準) は 45Kであり、CM化度は0.9 であった。

このカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩 (3.7 g) を水に溶解し、Bio-Rad AG 50W-X2 (200-400 メッシュ、 $H^+$  型) カラムにのせ、水で溶出した。この溶出液にトリエチルアミン (5.8 ml) を加えた後、凍結乾燥して標記化合物 (4.4 g) を得た。

例46: カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-A' (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)の合成

例45で得られたカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(4.4 g)をN,N-ジメチルホルムアミド(300 ml)に溶解させた。この溶液に、トリエチルアミン(0.19 ml)と3'-N-(Gly-Gly-Gly-Phe)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)のトリフルオロ酢酸塩(580 mg)を含むN,N-ジメチルホルムアミド(45 ml)溶液、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(4.4 g)を順次加え、遮光して室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液を1 M 水酸化ナトリウム水溶液で pH 10に調整した後、5 mlずつを各25 mlのエタノール中に滴下した。これに3 M 塩化ナトリウム水溶液(1 ml)、ジエチルエーテル(5 ml)を加えて、析出した沈澱を遠心分離(3500 rpm, 8分)により集めた。この沈澱を水に溶解し、透析膜(スペクトルポア1、カットオフ分子量 6000-8000)を用いて、純水に対して透析し、透析内液をミリポアフィルター(0.22 μm)で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物(3.4 g)を得た。本化合物の医薬化合物残基の含量を0.1 トリス緩衝液(pH 9.0)中での362 nmにおける吸光度に基づいて定量したところ、4.6% (W/W)であった。

例47: α-メチルカルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-A' (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)の合成

例45で得られたデキストランポリアルコール(2 g)を、水酸化ナトリウム(14 g)を水(60 ml)に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でα-ブロモプロピオン酸(19 ml)を加えて溶解させた後、室温で18時間反応させた。この反応液を酢酸で pH 8 に調整した後、バイオマックス-50膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥して、α-メチルカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(2.95 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、45Kであった。糖残基あたりのα-メチルカルボキシメチル化度は、カルボキシメチルデキストランポリアルコールの場合に準じて以下の様に求めた。α-メチルカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩の水溶液をBio-Rad AG 50W-X2 (H<sup>+</sup>型)カラムに付し、通過液を凍結乾燥して試料として用いた。この試料を所

定過剰量の0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、フェノールフタレインを指示薬として0.1 N 塩酸で滴定した。試料の採取量を  $s$  mg、0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液の所定過剰量を  $a$  (ml)、0.1 N 塩酸の滴定量を  $b$  (ml) とし、 $\alpha$ -メチルカルボキシメチル化度を  $13.4(a-b)/[s-7.2(a-b)]$  の式により求めた。その結果  $\alpha$ -メチルカルボキシメチル化度は0.8 であった。

この  $\alpha$ -メチルカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩 (2.2 g) を水に溶解し、Bio-Rad AG 50W-X2 (200-400 メッシュ、 $H^+$  型) カラム (直径 44 mm、長さ 210 mm) にのせ、水で溶出した。この溶出液にトリエチルアミン (4 ml) を加えた後、凍結乾燥して  $\alpha$ -メチルカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩 (2.69 g) を得た。

この  $\alpha$ -メチルカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩 (2.68 g) を  $N,N$ -ジメチルホルムアミド (60 ml) に溶解した。この溶液に、例2と同様に合成した  $3'-N-(\text{Boc-Gly-Gly-Gly-Phe})-\text{NH-A}$  ( $A-\text{NH}_2 = \text{DX-8951}$ ) (350 mg) から例16と同様の方法で脱Boc 化して得られる  $3'-N-(\text{Gly-Gly-Gly-Phe})-\text{NH-A}$  のトリフルオロ酢酸塩とトリエチルアミン (0.116 ml) を  $N,N$ -ジメチルホルムアミド (10 ml) に溶かして得られる溶液、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン (2.68 g) を  $N,N$ -ジメチルホルムアミド (10 ml) に溶かして得られる溶液を順次加え、室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液に3 M 塩化ナトリウム水溶液 (40 ml) を加え、6 ml ずつを各30 ml のエタノール中に滴下した。それぞれに3 M 塩化ナトリウム水溶液 (1 ml)、ジエチルエーテル (5 ml) を加えて、析出した沈澱を遠心分離 (3500 rpm, 8分) により集めた。この沈澱をアセトンで洗浄した後、水に溶解し、3 M 塩化ナトリウム水溶液 (10 ml) を加え、0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で pH 9 に調整し、37°Cで1時間処理した。この処理液をバイオマックス-10 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター (0.22  $\mu\text{m}$ ) で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物 (2.15 g) を得た。本化合物を0.1 M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC (カラム: 東ソー TSK Gel PW-4000XL、溶媒: 0.1M NaCl、流速: 0.8 ml/min) で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル (0.1 M トリス緩衝液, pH 9.0, 0.21 mg/ml) をそれぞれ図20および図21に示す。本化合物の医薬化合

物残基の含量を0.1 M トリス緩衝液 (pH 9.0) 中での 362 nm における吸光度に基づいて定量したところ、5.9% (W/W) であった。

例48 : 3'-N-(Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)トリフルオロ酢酸塩の合成

Phe-Gly-OBzlのp-トルエンスルホン酸塩 (3.06 g)、Boc-Gly-OH (1.10 g)、N-ヒドロキシスクシンイミド (941 mg)、N-メチルモルフォリン (0.725 ml)、N,N-ジメチルホルムアミド(40 ml) の混合物を4℃に冷却した後、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (1.56 g) を加えた。室温で一晩攪拌しながら反応させた後、反応液を減圧乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液 : ジクロロメタン : メタノール=98 : 2 溶液) で精製してBoc-Gly-Phe-Gly-OBzl (1.93 g) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ : 8.52 (dd, 1H, J=5.6, 6.4Hz), 7.97 (d, 1H, J=8.8Hz), 7.30-7.39 (m, 5H), 7.15-7.26 (m, 5H), 6.83 (t, 1H, J=5.6Hz), 5.14 (s, 1H), 4.52-4.57 (m, 1H), 3.87-3.96 (m, 2H), 3.57 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.43 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.01 (dd, 1H, J=4.8, 14.3Hz), 2.77 (dd, 1H, J=5.6, 14.3Hz), 1.37 (s, 9H).

得られたBoc-Gly-Phe-Gly-OBzl (1.78 g) を酢酸エチル(60 ml) に溶解し、5% -Pd-C (1.8 g) 存在下、24時間接触還元した。触媒を濾去し、濾液を減圧濃縮し、Boc-Gly-Phe-Gly-OH (1.41 g) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ : 8.35 (t, 1H, J=5.6Hz), 7.94 (d, 1H, J=8.8Hz), 7.15-7.26 (m, 5H), 6.85 (dd, 1H, J=5.6, 6.4Hz), 4.52-4.58 (m, 1H), 3.76 (d, 2H, J=5.6Hz), 3.56 (dd, 1H, J=6.4, 16.7Hz), 3.43 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.03 (dd, 1H, J=5.0, 13.5Hz), 2.79 (dd, 1H, J=9.5, 13.5Hz), 1.37 (s, 9H).

上で得られたBoc-Gly-Phe-Gly-OH (500 mg) およびN-ヒドロキシスクシンイミド (161 mg) をN,N-ジメチルホルムアミド(10 ml) に溶解した。この溶液に DX-8951 のメタンスルホン酸塩 (530 mg) とトリエチルアミン (0.146 ml) を溶解したN,N-ジメチルホルムアミド(50 ml) 溶液を加えて、4℃に冷却した後、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (268 mg) を加えて、遮光下に室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液を減圧乾固し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液 : ジクロロメタン : メタノール=96 : 4 溶液) で精製して3'-N-(Boc

-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951) (100 mg) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.39 (d, 1H, J=8.0Hz), 8.34 (t, 1H, J=5.6Hz), 7.98 (d, 1H, J=7.2Hz), 7.78 (d, 1H, J=10.3Hz), 7.33 (s, 1H), 7.13-7.24 (m, 5H), 6.80 (dd, 1H, J=5.6, 6.4Hz), 5.55-5.61 (m, 1H), 5.44 (d, 1H, J=16.0Hz), 5.41 (d, 1H, J=16.0Hz), 5.25 (s, 2H), 4.43-4.46 (m, 1H), 3.69-3.79 (m, 2H), 3.50 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.41 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.16-3.19 (m, 2H), 2.98 (dd, 1H, J=4.8, 14.3Hz), 2.79 (dd, 1H, J=9.5, 14.3Hz), 2.41 (s, 3H), 2.19-2.25 (m, 1H), 2.10-2.15 (m, 1H), 1.82-1.90 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, J=8.0Hz).

Mass (FAB); m/e 797 (M+1)

得られた3'-N-(Boc-Gly-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951) (100 mg) をトリフルオロ酢酸 (3 ml) に溶かし、1時間放置した。溶媒を留去し、メタノール(30 ml) で共沸を2回、エタノール(30 ml) で共沸を2回行った後、残渣をエーテルで洗浄して、標記化合物(80 mg) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.52-8.62 (m, 1H), 7.94 (s, 3H), 7.79 (t, 1H, J=11.1Hz), 7.34 (s, 1H), 7.15-7.27 (m, 5H), 6.52 (s, 1H), 5.57-5.61 (m, 1H), 5.36-5.46 (m, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.66-4.70 (m, 1H), 3.69-3.81 (m, 2H), 3.61-3.68 (m, 1H), 3.40-3.47 (m, 1H), 3.15-3.23 (m, 1H), 3.01 (dd, 1H, J=4.0, 13.5Hz), 2.77 (dd, 1H, J=9.5, 13.5Hz), 2.12-2.23 (m, 2H), 1.81-1.91 (m, 2H), 0.89 (t, 3H, J=7.2Hz).

Mass (FAB); m/e 697 (M+1)

例49: 3'-N-(Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)トリフルオロ酢酸塩の合成

Boc-Phe-Gly(771 mg) およびN-ヒドロキシスクシンイミド (300 mg) をN,N-ジメチルホルムアミド(10 ml) に溶解した。この溶液に DX-8951 のメタンスルホン酸塩(1058 mg) とトリエチルアミン (0.293 ml) を溶解したN,N-ジメチルホルムアミド(50 ml) 溶液を加えて、4℃に冷却した後、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (494 mg) を加えて、遮光下に室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液を減圧乾固し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液: ジクロロメタン: メタノール=98: 2 溶液) で精製して3'-N-(Boc-Phe-Gly)-NH-A (A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)(1.20 g)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 8.29 (d, 1H,  $J=8.0\text{Hz}$ ), 8.21 (t, 1H,  $J=4.8\text{Hz}$ ), 7.76 (d, 1H,  $J=10.3\text{Hz}$ ), 7.32 (s, 1H), 7.13-7.25 (m, 5H), 6.92 (d, 1H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 6.49 (s, 1H), 5.56-5.61 (m, 1H), 5.44 (d, 1H,  $J=15.9\text{Hz}$ ), 5.38 (d, 1H,  $J=15.9\text{Hz}$ ), 5.25 (s, 2H), 4.08-4.12 (m, 1H), 3.78 (d, 1H,  $J=4.8\text{Hz}$ ), 3.16-3.25 (m, 2H), 2.99 (dd, 1H,  $J=4.0, 13.5\text{Hz}$ ), 2.72 (dd, 1H,  $J=10.3, 13.5\text{Hz}$ ), 2.40 (s, 3H), 2.09-2.35 (m, 2H), 1.80-1.91 (m, 2H), 1.16 (s, 9H), 0.88 (t, 3H,  $J=8.0\text{Hz}$ ).

Mass (FAB);  $m/e$  741 ( $M+1$ )

上で得られた3'-N-(Boc-Phe-Gly)-NH-A (170 mg)をトリフルオロ酢酸 (4 ml) に溶かし、1時間放置した。溶媒を留去し、メタノール(10 ml) で共沸を2回、エタノール(10 ml) で共沸を2回行った後、残渣をエーテルで洗浄して、標記化合物 (100 mg) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 8.88 (t, 1H,  $J=4.8\text{Hz}$ ), 8.68 (d, 1H,  $J=8.7\text{Hz}$ ), 8.05-8.15 (m, 3H), 7.79 (d, 1H,  $J=11.1\text{Hz}$ ), 7.26-7.36 (m, 5H), 6.52 (d, 1H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 5.57-5.62 (m, 1H), 5.43 (d, 1H,  $J=15.9\text{Hz}$ ), 5.38 (d, 1H,  $J=15.9\text{Hz}$ ), 5.19-5.28 (m, 1H), 4.10-4.18 (m, 1H), 3.93 (dd, 1H,  $J=4.8, 16.7\text{Hz}$ ), 3.82 (dd, 1H,  $J=4.8, 16.7\text{Hz}$ ), 3.17-3.24 (m, 2H), 3.14 (dd, 1H,  $J=4.8, 13.5\text{Hz}$ ), 2.95 (dd, 1H,  $J=8.0, 13.5\text{Hz}$ ), 2.42 (s, 3H), 2.14-2.25 (m, 2H), 1.83-1.91 (m, 2H), 0.89 (t, 3H,  $J=8.0\text{Hz}$ ).

Mass (FAB);  $m/e$  640 ( $M+1$ )

#### 例50: 3'-N-Gly-NH-A ( $A\text{-NH}_2 = \text{DX-8951}$ )トリフルオロ酢酸塩の合成

DX-5981 のメタンスルホン酸塩 (530 mg) とトリエチルアミン(0.28 ml) をN, N-ジメチルホルムアミド(10 ml) に溶解し、4℃に冷却した後、Boc-Gly のN-ヒドロキシスクシンイミドエステル (327 mg) を加えた。遮光下に室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液を減圧乾固し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液: ジクロロメタン: メタノール=98:2 溶液) で精製して3'-N-(Boc-Gly)-NH-A ( $A\text{-NH}_2 = \text{DX-8951}$ ) (500 mg) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 8.38 (d, 1H,  $J=8.3\text{Hz}$ ), 7.77 (d, 1H,  $J=10.7\text{Hz}$ ), 7.31 (s, 1H), 6.89-6.91 (m, 1H), 6.49 (s, 1H), 5.55-5.59 (m, 1H), 5.45 (d, 1H,  $J=16.1\text{Hz}$ ), 5.38 (d, 1H,  $J=16.1\text{Hz}$ ), 5.27 (d, 1H,  $J=19.0\text{Hz}$ ), 5.18 (d, 1H,  $J=19.0\text{Hz}$ ), 3.50-3.62 (m, 2H), 3.15-3.19 (m, 2H), 2.41 (s, 3H), 2.18-2.24 (m, 1H), 2.08-2.12

(m, 1H), 1.81-1.91 (m, 2H), 1.31 (s, 9H), 0.87 (t, 3H, J=8.0Hz).

Mass (FAB); m/e 593 (M+1)

上で得られた3'-N-(Boc-Gly)-NH-A (100 mg)をトリフルオロ酢酸 (2 ml) に溶かし、1時間放置した。溶媒を留去し、メタノール(10 ml) で共沸を2回、エタノール(10 ml) で共沸を2回行った後、残渣をエーテルで洗浄して、標記化合物(70 mg)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8.88 (d, 1H, J=8.8Hz), 8.08 (s, 3H), 7.81 (d, 1H, J=11.2Hz), 7.34 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.63-5.67 (m, 1H), 5.45 (d, 1H, J=16.7Hz), 5.40 (d, 1H, J=16.7Hz), 5.36 (d, 1H, J=19.1Hz), 5.25 (d, 1H, J=19.1Hz), 3.56 (s, 2H), 3.11-3.19 (m, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.23-2.28 (m, 1H), 2.11-2.19 (m, 1H), 1.81-1.91 (m, 2H), 0.88 (t, 3H, J=8.0Hz).

Mass (FAB); m/e 493 (M+1)

#### 例51: カルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリメチルアンモニウム塩の合成

デキストランT500 (50 g, ファルマシア社製, 分子量 500K) を0.1 M 酢酸緩衝液 (pH5.5, 5000 ml) に溶解し、過ヨウ素酸ナトリウム(165.0 g) の水溶液(5000 ml)を加えた。遮光しながら4℃で10日間攪拌した後、エチレングリコール(35.0 ml)を加え、一晩攪拌した。反応液を8 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH 7 に調整した。水素化ホウ素ナトリウム (70 g) を加えて溶解した後、一晩攪拌した。反応液を氷冷し、酢酸で pH 5.5 に調整して4℃で1時間攪拌した後、8 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH 7.5 に調整した。得られた水溶液をバイオマックス-50 膜を用いて限外濾過法による脱塩を行なった。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥して、デキストランポリアルコール (20.2 g) を得た。この物質の分子量 (ゲル濾過、プルラン標準) は、159Kであった。

このデキストランポリアルコール(7.5 g) を、水酸化ナトリウム (31.5 g) を水 (225 ml) に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸 (45 g) を加えて溶解させた後、室温で一晩反応させた。この反応液を酢酸でpHを8に調整した後、バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥してカルボキシメチルデキ

ストランポリアルコールのナトリウム塩(8.5 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は 274K であり、カルボキシメチル化度は0.4 であった。このカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(2.0 g)を水に溶解し、Bio-Rad AG 50W-X2 (200-400 メッシュ、 $H^+$  型) カラム(直径 44 mm、長さ 210 mm)にのせ、水で溶出した。この溶出液にトリエチルアミン(4 ml)を加えた後、凍結乾燥して標記化合物(2.2 g)を得た。

例52：カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Phe-Gly-NH-A'(A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)の合成

例51で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(200 mg)をN,N-ジメチルホルムアミド(7 ml)に溶解させた。この溶液に、例48で得た3'-N-(Gly-Phe-Gly)-NH-A(A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)のトリフルオロ酢酸塩(41 mg)のN,N-ジメチルホルムアミド(5 ml)溶液、トリエチルアミン(0.014 ml)、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(100 mg)を順次加え、室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液の5 mlずつを各10 mlのエタノール中に滴下した。これに3 M 塩化ナトリウム水溶液(2.0 ml)、ジエチルエーテル(25 ml)を加えて、析出した沈澱を遠心分離(3500 rpm, 8分)により集めた。この沈澱を0.5 M 食塩水に溶解し、氷冷下0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で pH 9 とした。得られた水溶液をバイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22  $\mu$ m)で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物(190 mg)を得た。本化合物の医薬化合物残基の含量を0.1 M トリス緩衝液(pH 9.0)中での 362 nm における吸光度に基づいて定量したところ 4.5% (W/W) であった。

例53：カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Phe-Gly-NH-A'(A-NH<sub>2</sub> =DX-8951)の合成

例24で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(2.5 g)を水に溶解し、Bio-Rad AG 50W-X2 (200-400 メッシュ、 $Et_3N H^+$  型) カラムにのせ、水で溶出した。この溶出液を凍結乾燥してカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(2.5 g)を得た。

このカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム

塩 (200 mg) をN,N-ジメチルホルムアミド(12 ml) に溶解させた。この溶液に、例49で得た3'-N-(Phe-Gly)-NH-A ( $A-NH_2 = DX-8951$ ) のトリフルオロ酢酸塩(42 mg) とトリエチルアミン (0.016 ml) のN,N-ジメチルホルムアミド (5 ml) 溶液、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン (200 mg) を順次加え、遮光して室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液に水 (300 ml) を加え、限外濾過膜10K (フィルترون社製) を用いて限外濾過した。膜を通過しない残留溶液を0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液で pH 10とし、濾過膜 (0.16  $\mu m$ 、フィルترون社製) を通過させた。通過した溶液をバイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩し、次いでミリポアフィルター(0.22  $\mu m$ )で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物 (180 mg) を得た。本化合物の医薬化合物残基の含量を0.1 M トリス緩衝液 (pH 9.0) 中での 362 nm における吸光度に基づいて定量したところ 6.1% (W/W) であった。

例54：カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-NH-A' ( $A-NH_2 = DX-8951$ ) の合成

例51で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩 (370 mg) をN,N-ジメチルホルムアミド(10 ml) に溶解させた。この溶液に、例50で得た3'-N-Gly-NH-A ( $A-NH_2 = DX-8951$ ) のトリフルオロ酢酸塩(57 mg) のN,N-ジメチルホルムアミド (3 ml) 溶液、トリエチルアミン (0.027 ml)、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン (185 mg) を順次加え、室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液の5 mlずつを各10 ml のエタノール中に滴下した。これに3 M 塩化ナトリウム水溶液 (2.0 ml)、ジエチルエーテル(25 ml) を加えて、析出した沈澱を遠心分離 (3500 rpm, 8分) により集めた。この沈澱を0.5 M 食塩水に溶解し、氷冷下0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で pH 9 とした。得られた水溶液をバイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22  $\mu m$ )で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物 (290 mg) を得た。本化合物の医薬化合物残基の含量を0.1 M トリス緩衝液 (pH 9.0) 中での 362 nm における吸光度に基づいて定量したところ 0.5% (W/W) であった。

例55：カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-D51-7059

### の合成

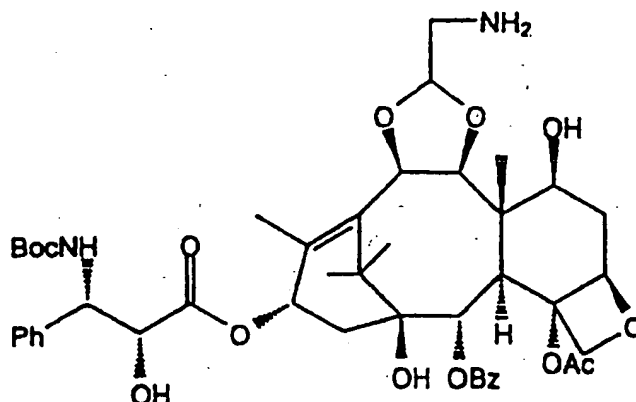
Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-OH (200 mg) をトリフルオロ酢酸 (4 ml) に溶かし、1.5 時間攪拌した。溶媒を留去し、メタノール(10 ml) で共沸を 2 回、エタノール(10 ml) で共沸を 2 回行った後、残渣をエーテルで洗浄して、Gly-Gly-Phe-Gly-OH のトリフルオロ酢酸塩 (225 mg) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8.48 (dd, 1H,  $J=5.6, 5.6\text{Hz}$ ), 8.59 (dd, 1H,  $J=5.6, 6.4\text{Hz}$ ), 8.29 (d, 1H,  $J=4.8\text{Hz}$ ), 7.23-7.26 (m, 4H), 7.16-7.20 (m, 1H), 4.58 (ddd, 1H,  $J=4.8, 4.8, 10.4\text{Hz}$ ), 3.89 (dd, 1H,  $J=5.6, 16.7\text{Hz}$ ), 3.76-3.79 (m, 2H), 3.67 (dd, 1H,  $J=5.6, 16.7\text{Hz}$ ), 3.56 (s, 2H).

上で得られた Gly-Gly-Phe-Gly-OH のトリフルオロ酢酸塩 (200 mg) を、水(10 ml) に溶解し、トリエチルアミンを加えて pH 9.0 に調整した後、9-フレオレニルメチルN-ヒドロキシスクシンイミジルカルボネート (200 mg) のアセトニトリル (5 ml) 溶液を加え、次いでトリエチルアミンを用いて pH 8.0-8.5 に維持しながら室温で 4 時間攪拌した。反応液に 1.5 N 塩酸 (50 ml) を加え、析出した沈澱を濾取し、水で洗浄した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液: ジクロロメタン: メタノール = 4 : 1 溶液) で精製して Fmoc-Gly-Gly-Phe-Gly-OH (151 mg) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8.28-8.32 (m, 1H), 8.08-8.12 (m, 1H), 7.85-7.89 (m, 2H), 7.68-7.72 (m, 2H), 7.57-7.65 (m, 1H), 7.38-7.43 (m, 2H), 7.29-7.34 (m, 2H), 7.20-7.25 (m, 4H), 7.14-7.17 (m, 1H), 4.45-4.52 (m, 1H), 4.26-4.30 (m, 2H), 4.19-4.24 (m, 1H), 3.77 (dd, 1H,  $J=5.6, 16.7\text{Hz}$ ), 3.58-3.69 (m, 4H), 3.42-3.52 (m, 1H), 3.06 (dd, 1H,  $J=4.0, 13.5\text{Hz}$ ), 2.78 (dd, 1H,  $J=4.0, 13.5\text{Hz}$ ).

上で得られた Fmoc-Gly-Gly-Phe-Gly-OH (24 mg)、下記の式:



で表されるタキソール誘導体 (D51-7059: 9,10-0-(2-アミノエチリデン)-13-0-[3-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)-2-ヒドロキシ-3-フェニル]-プロパノイル-10-デアセチル-9-ジヒドロバカチン III) (20 mg) およびN-ヒドロキシスクシンイミド (7 mg) をN,N-ジメチルホルムアミド (1 ml) に溶解した。この溶液を4℃に冷却した後、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (9 mg) を添加し、室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液を減圧乾固し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液: ジクロロメタン: メタノール=96:4 溶液) で精製してFmoc-Gly-Gly-Phe-Gly-D51-7059 (21 mg) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.06 (d, 2H,  $J=8.1\text{Hz}$ ), 7.75 (d, 2H,  $J=8.1\text{Hz}$ ), 7.18-7.61 (m, 23H), 7.62 (dd, 1H,  $J=7.2, 8.0\text{Hz}$ ), 6.07 (dd, 1H,  $J=7.9, 8.8\text{Hz}$ ), 5.98 (d, 1H,  $J=4.8\text{Hz}$ ), 5.63 (d, 1H,  $J=8.8\text{Hz}$ ), 5.00-5.40 (m, 4H), 4.92 (s, 1H), 4.60-4.69 (m, 2H), 4.41 (d, 2H,  $J=6.4\text{Hz}$ ), 4.35 (d, 1H,  $J=8.0\text{Hz}$ ), 4.29 (d, 1H,  $J=8.0\text{Hz}$ ), 4.21 (t, 1H,  $J=7.5\text{Hz}$ ), 3.96-4.07 (m, 3H), 3.73-3.86 (m, 4H), 3.37-3.41 (m, 1H), 3.19-3.23 (m, 1H), 3.00 (dd, 1H,  $J=8.0, 13.5\text{Hz}$ ), 2.85-2.89 (m, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.05-2.40 (m, 4H), 1.57 (s, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.53 (s, 3H), 1.40 (s, 9H), 1.22 (s, 3H).

Mass (FAB);  $m/e$  1413 ( $M+\text{Na}$ )

上記で得られたFmoc-Gly-Gly-Phe-Gly-D51-7059 (21 mg) をジクロロメタン (1.8 ml) に溶解させ、ピペラジン (0.2 ml) を加えた後、室温で1時間反応させた。この反応液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液: ジクロロメタン: メタノール=94:6 溶液) で精製してGly-Gly-Phe-Gly-D51-7059 (16 mg) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.10 (d, 2H,  $J=8.1\text{Hz}$ ), 7.89-7.94 (m, 1H), 7.62 (dd, 1H,  $J=7.2, 8.0\text{Hz}$ ), 7.45-7.50 (m, 2H), 7.17-7.42 (m, 12H), 7.10-7.16 (m, 1H), 6.97 (dd, 1H,  $J=5.6, 6.4\text{Hz}$ ), 6.08 (dd, 1H,  $J=8.0, 8.7\text{Hz}$ ), 6.02 (d, 1H,  $J=4.8\text{Hz}$ ), 5.62 (d, 1H,  $J=11.1\text{Hz}$ ), 5.23-5.30 (m, 1H), 5.23 (d, 1H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 5.10 (s, 1H), 4.98-5.00 (m, 1H), 4.60-4.63 (m, 1H), 4.38 (d, 1H,  $J=8.8\text{Hz}$ ), 4.33 (d, 1H,  $J=8.8\text{Hz}$ ), 4.13 (s, 1H), 4.04 (dd, 1H,  $J=5.6, 16.7\text{Hz}$ ), 3.93 (dd, 1H,  $J=5.6, 16.7\text{Hz}$ ), 3.82 (d, 1H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 3.73-3.82 (m, 2H), 3.43-3.49 (m, 1H), 3.30-3.38 (m, 2H), 3.24 (dd, 1H,  $J=6.4, 14.3\text{Hz}$ ), 3.04 (dd, 1H,  $J=8.0, 14.3\text{Hz}$ ), 2.89-3.07 (m, 3H), 2.30 (s, 3H), 2.01-2.50 (m, 4H), 1.70 (s, 3H), 1.62 (s, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.40 (s, 9H), 1.26 (s, 3H).

Mass (FAB);  $m/e$  1169 ( $M+1$ )

以上の方法で合成したGly-Gly-Phe-Gly-D51-7059(33 mg) をN,N-ジメチルホルムアミド (0.5 ml) に溶解させた。この溶液に、例24で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩 (180 mg) のN,N-ジメチルホルムアミド (7 ml) 溶液、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン (180 mg) を順次加え、室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液の4 mlずつを各10 mlのエタノール中に滴下した。それぞれに3 M 塩化ナトリウム水溶液 (2.0 ml)、ジエチルエーテル(25 ml)を加えて、析出した沈澱を遠心分離 (2500 rpm, 8分) により集めた。この沈澱をエタノールで洗浄した後、水に溶解し、Bio-Rad AG 50W-X2 (200-400 メッシュ、 $\text{Na}^+$  型) カラム (直径 15 mm、長さ 85 mm) にのせ、水で溶出し、溶出液1を得た。別に、Gly-Gly-Phe-Gly-D51-7059 (10 mg) をN,N-ジメチルホルムアミド (0.5 ml) に溶解させた後、例24で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(60 mg) のN,N-ジメチルホルムアミド (5 ml) 溶液、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(60 mg) のN,N-ジメチルホルムアミド(0.25 ml) 溶液を順次加え、室温で一晩攪拌しながら反応させた。この反応液を10 mlのエタノール中に滴下した後、3 M 塩化ナトリウム水溶液 (2.0 ml)、ジエチルエーテル(25 ml)を加え、析出した沈澱を遠心分離 (2500 rpm, 8分) により集めた。この沈澱をエタノールで洗浄した後、水に溶解し、Bio-Rad AG 50W-X2 (200-400 メッシ

ユ、Na<sup>+</sup>型) カラム (直径 15 mm、長さ 85 mm) にのせ、水で溶出し、溶出液 2 を得た。溶出液 1 と溶出液 2 を合した後、バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター (0.22  $\mu$ m) で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物 (208 mg) を得た。本化合物を 0.1 M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC (カラム: 東ソー TSK Gel PW-4000XL、溶媒: 0.1M NaCl、流速: 0.8 ml/min) で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル (メタノール: 水=10:1 溶液、1.69 mg/ml) をそれぞれ図22および図23に示す。本化合物の医薬化合物残基の含量をメタノール: 水=10:1 溶液中での 240 nm における吸光度に基づいて定量したところ、5.3% (W/W) であった。

#### 例56: 本発明の薬物複合体の抗腫瘍作用

例11と同様の方法により Meth A 担癌マウスを作成し (1群6匹)、例15の薬物複合体について、例12と同様の方法で単回投与した場合の抗腫瘍作用を調べた。その結果、例15の薬物複合体は例12の医薬化合物自体に比べて、顕著な抗腫瘍効果の増強と有効用量域の拡大を示した。

被検化合物	投与量 (mg/kg) <sup>1)</sup>	抑制率 (%)
例15の化合物	10	100
	5	99
	2.5	95
	1.25	83

<sup>1)</sup> 医薬化合物換算量

#### 例57: 本発明の薬物複合体の抗腫瘍作用

ヒト胃癌 SC-6 の腫瘍塊をヌードマウス (BALB/c-nu/nu, 雄) の右鼠径部皮下に移植して SC-6 担癌ヌードマウスを作成した (1群5匹)。移植後24日目に注射用蒸留水に溶解した例15の薬物複合体を静脈内に単回投与し、抗腫瘍作用を医薬化合物自体と比較した。その結果、例15の薬物複合体は医薬化合物自体に比べて、毒性死を示すことなく、高い抗腫瘍効果を発揮した。

被検化合物	投与量(mg/kg)	抑制率(%)	死亡マウス数/使用マウス数
医薬化合物自体	60	98	2/5
	15	61	0/5
例15の化合物	8 <sup>1)</sup>	100	0/5
	2 <sup>1)</sup>	71	0/5

1) 医薬化合物換算量

例58：本発明の薬物複合体の抗腫瘍作用

例57と同様の方法によりヒト肺癌 QG-90担癌ヌードマウスを作成した（1群5匹）。移植後16日目に注射用蒸留水に溶解した例15の薬物複合体を静脈内に単回投与し、抗腫瘍作用を医薬化合物自体と比較した。その結果、例15の薬物複合体は医薬化合物自体に比べて、顕著な抗腫瘍効果の増強と有効用量域の拡大を示した。

被検化合物	投与量(mg/kg)	抑制率(%)	死亡マウス数/使用マウス数
医薬化合物自体	50	60	0/5
	12.5	51	0/5
例15の化合物	7 <sup>1)</sup>	98	0/5
	1.75 <sup>1)</sup>	97	0/5

1) 医薬化合物換算量

例59：本発明の薬物複合体の抗腫瘍作用

例11と同様の方法により Meth A 担癌マウスを作成し（1群6匹）、例12と同様の方法で例41の薬物複合体を単回投与した場合の抗腫瘍作用を医薬化合物自体と比較した。その結果、例41の薬物複合体は医薬化合物自体に比べて、顕著な抗腫瘍効果の増強と有効用量域の拡大を示した。

被検化合物	投与量(mg/kg)	抑制率(%)
医薬化合物自体	100	64
	50	56
	25	34
例41の化合物	25 <sup>1)</sup>	99
	12.5 <sup>1)</sup>	95
	6.25 <sup>1)</sup>	81
	3.125 <sup>1)</sup>	61

<sup>1)</sup> 医薬化合物換算量

例60：本発明の薬物複合体の抗腫瘍作用

例11と同様の方法により Meth A 担癌マウスを作成し（1群6匹）、例12と同様の方法で例29、例46および例47の各薬物複合体をそれぞれ単回投与した場合の抗腫瘍作用を調べた。

その結果、何れの薬物複合体も高い抗腫瘍効果と広い有効用量域を示した。

被検化合物	投与量(mg/kg) <sup>1)</sup>	抑制率(%)
例29の化合物	30	99
	20	99
	10	89
	5	79
例46の化合物	100	94
	80	92
	40	82
	20	75
例47の化合物	100	96

80	94
40	97
20	75

1) 医薬化合物換算量

例61：本発明の薬物複合体の抗腫瘍作用

例11と同様の方法により Meth A 担癌マウスを作成し（1群6匹）、例44の薬物複合体について、例12と同様の方法で単回投与して抗腫瘍作用を医薬化合物自体（ドキソルビシン）と比較した。その結果、例44の薬物複合体は医薬化合物自体に比べて、顕著な抗腫瘍効果の増強と有効用量域の拡大を示した。

被検化合物	投与量(mg/kg)	抑制率(%)	死亡マウス数／使用マウス数
医薬化合物自体	20		6/6
	10	64	0/6
	5	39	0/6
例44の化合物	40 <sup>1)</sup>	96	0/6
	20 <sup>1)</sup>	96	0/6
	10 <sup>1)</sup>	87	0/6
	5 <sup>1)</sup>	76	0/6

1) 医薬化合物換算量

例62：本発明の薬物複合体の体内動態

例11と同様の方法により Meth A 担癌マウスを作成し、例15の薬物複合体について、例12と同様の方法で単回投与（10 mg/kg：医薬化合物換算量）して、薬物複合体の各組織内における濃度推移を調べた。その結果、例15の薬物複合体は著しく高い血中滞留性、腫瘍組織への高い移行性および肝臓と小腸に対する高い腫瘍選択性を示した。結果を図24に示す。

#### 産業上の利用可能性

例えば抗腫瘍剤である医薬化合物の残基を導入した本発明の薬物複合体は、腫瘍部位選択性に優れており、高い抗腫瘍作用を発揮できるとともに、毒性の発現も軽減されているという特徴を有している。

## 請 求 の 範 囲

1. 1個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した2~8個のアミノ酸からなるスペーサーを介してカルボキシC<sub>1-4</sub>アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とが結合していることを特徴とする薬物複合体。
2. カルボキシC<sub>1-4</sub>アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールであることを特徴とする、請求の範囲第1項に記載の薬物複合体。
3. カルボキシC<sub>1-4</sub>アルキルデキストランポリアルコールがカルボキシメチルデキストランポリアルコールである請求の範囲第1項または第2項に記載の薬物複合体。
4. 医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の薬物複合体。
5. 医薬化合物が濃度依存型の抗腫瘍作用を発現する抗腫瘍剤である請求の範囲第4項に記載の薬物複合体。
6. 医薬化合物が時間に依存した抗腫瘍作用を発現する抗腫瘍剤である請求の範囲第4項に記載の薬物複合体。
7. 抗腫瘍剤がドキソルビシン又は(1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[de]ピラノ[3', 4':6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13(9H, 15H)-ジオンである請求の範囲第4項に記載の薬物複合体。
8. スペーサーが-X-Z-で表されるジペプチド(-X-Z-は疎水性アミノ酸(X)と親水性アミノ酸(Z)とがそれぞれN末端側及びC末端側となってペプチド結合して形成されるジペプチドのN末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基から、それぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を示す)であるか、又は該ジペプチドを部分ペプチド配列として含むスペーサーである請求の範囲第5項ないし7項のいずれか1項に記載の薬物複合体。
9. 疎水性アミノ酸がフェニルアラニンであり、親水性アミノ酸がグリシンであ

る請求の範囲第8項に記載の薬物複合体。

10. スペーサーが(N末端)-Gly-Gly-Phe-Gly-である請求の範囲第9項に記載の薬物複合体。

11. 抗腫瘍剤の残基の導入量が1~15重量%の範囲である請求の範囲第5項ないし第10項のいずれか1項に記載の薬物複合体。

12. 抗腫瘍剤の残基の導入量が3~10重量%の範囲である請求の範囲第5項ないし第10項のいずれか1項に記載の薬物複合体。

13. 抗腫瘍剤の残基の導入量が5~6重量%の範囲である請求の範囲第5項ないし第10項のいずれか1項に記載の薬物複合体。

14.  $\text{H}_2\text{N-Gly-Gly-Phe-Gly-COOH}$ で示されるペプチドのN末端がカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基に酸アミド結合しており、該ペプチドのC末端が(1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[de]ピラノ[3', 4':6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13(9H, 15H)-ジオンの1-アミノ基と酸アミド結合した請求の範囲第1項に記載の薬物複合体。

15. (1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[de]ピラノ[3', 4':6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13(9H, 15H)-ジオン残基の導入量が2~10重量%の範囲である請求の範囲第14項に記載の薬物複合体。

16. カルボキシ $\text{C}_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールが分子量5,000ないし500,000の範囲のカルボキシメチルデキストランポリアルコールであり、カルボキシメチル化度が0.01~2.0の範囲である請求の範囲第14項又は第15項に記載の薬物複合体。

17. カルボキシ $\text{C}_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールが分子量50,000~450,000の範囲のカルボキシメチルデキストランポリアルコールであり、カルボキシメチル化度が0.1~1.0の範囲である請求の範囲第14項又は第15項に記載の薬物複合体。

18. カルボキシ $\text{C}_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールが分子量200,000~400,000の範囲のカルボキシメチルデキストランポリアルコールであり、カルボキシメ

チル化度が 0.3~0.5 の範囲である請求の範囲第14項又は第15項に記載の薬物複合体。

19. (1S, 9S)-1- アミノ-9- エチル-5- フルオロ-2, 3- ジヒドロ-9- ハイドロキシ-4- メチル-1H, 12H-ベンゾ[de]ピラノ[3', 4':6, 7] インドリジノ[1, 2-b] キノリン-10, 13(9H, 15H)- ジオン残基の導入量が 5~6 重量% の範囲であり、カルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールの分子量が約 228, 000であり、カルボキシメチル化度が約 0.4である請求の範囲第14項に記載の薬物複合体。

20. 医薬化合物を結合するための薬物送達のキャリアーであって、カルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールからなる薬物送達のキャリアー。

21. カルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールの分子量が 5, 000~500, 000 の範囲であり、カルボキシ $C_{1-4}$ アルキル化度が0.01~2.0 の範囲である請求の範囲第20項に記載の薬物送達のキャリアー。

22. カルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールの分子量が50, 000~450, 000 の範囲であり、カルボキシ $C_{1-4}$ アルキル化度が 0.1~1.0 の範囲である請求の範囲第20項に記載の薬物送達のキャリアー。

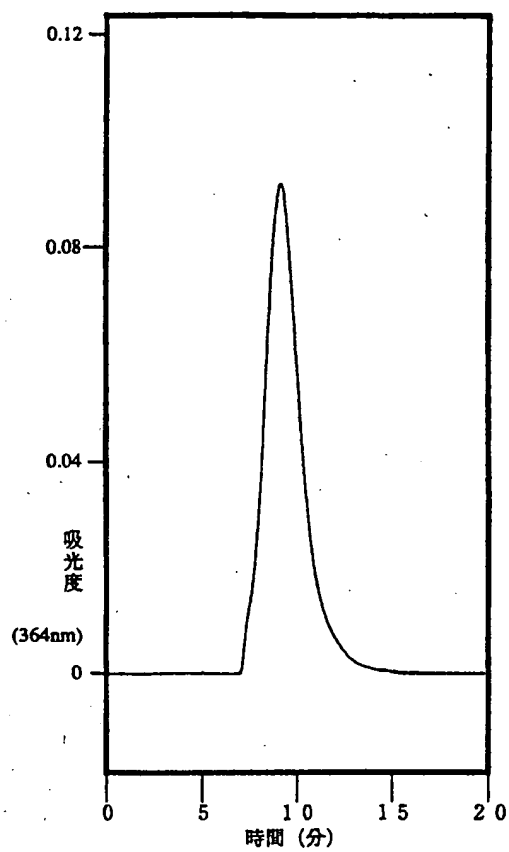
23. カルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールの分子量が 200, 000~400, 000 の範囲であり、カルボキシ $C_{1-4}$ アルキル化度が 0.3~0.5 の範囲である請求の範囲第20項に記載の薬物送達のキャリアー。

24. カルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールがカルボキシメチルデキストランポリアルコールである請求の範囲第20項ないし第23項のいずれか1項に記載の薬物送達のキャリアー。

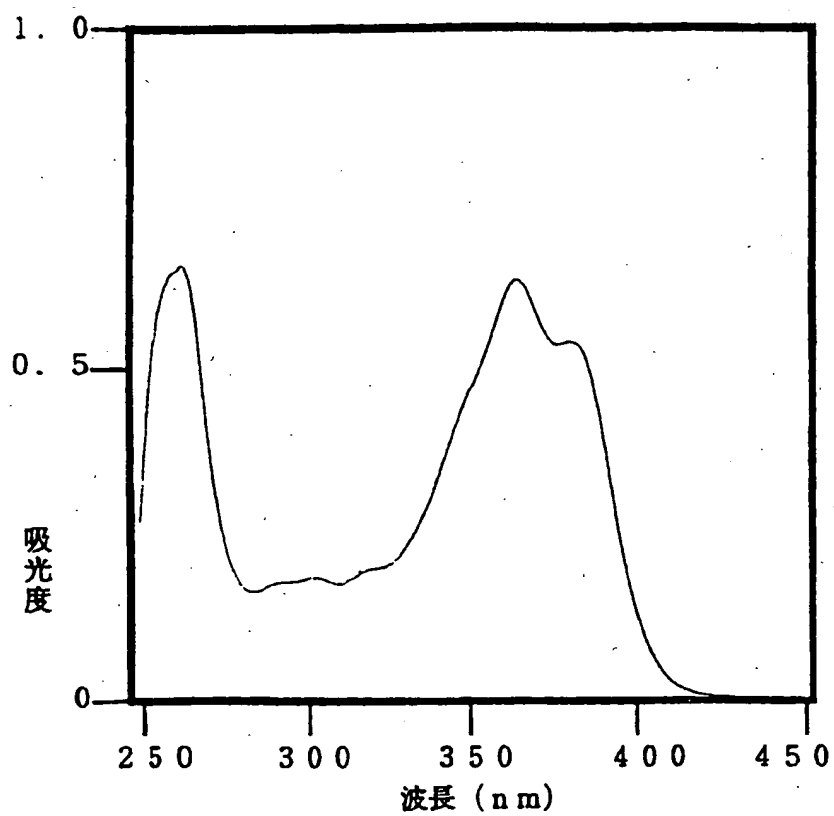
25. 医薬化合物の残基と結合したカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールを含む薬物複合体の製造のためのカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールの使用。

26. 医薬化合物の残基とカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールとがスペーサーを介して、又はスペーサーを介さずに結合した薬物複合体の製造のためのカルボキシ $C_{1-4}$ アルキルデキストランポリアルコールの使用。

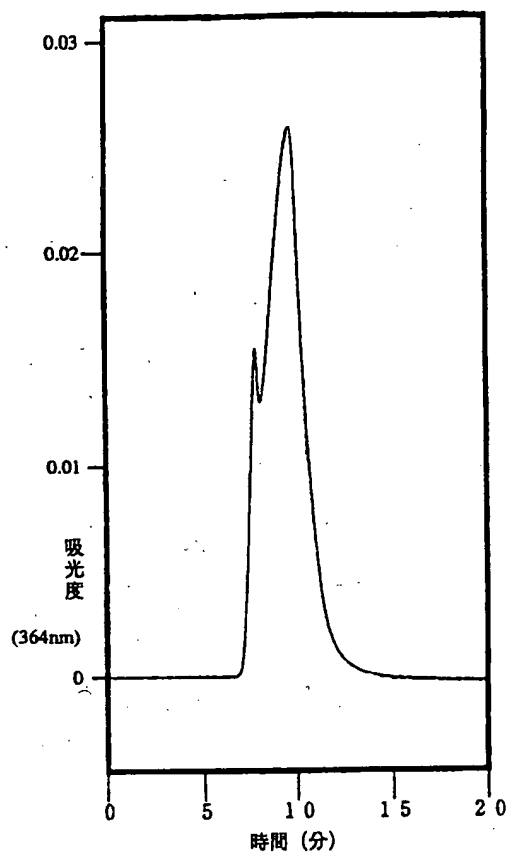
第1図



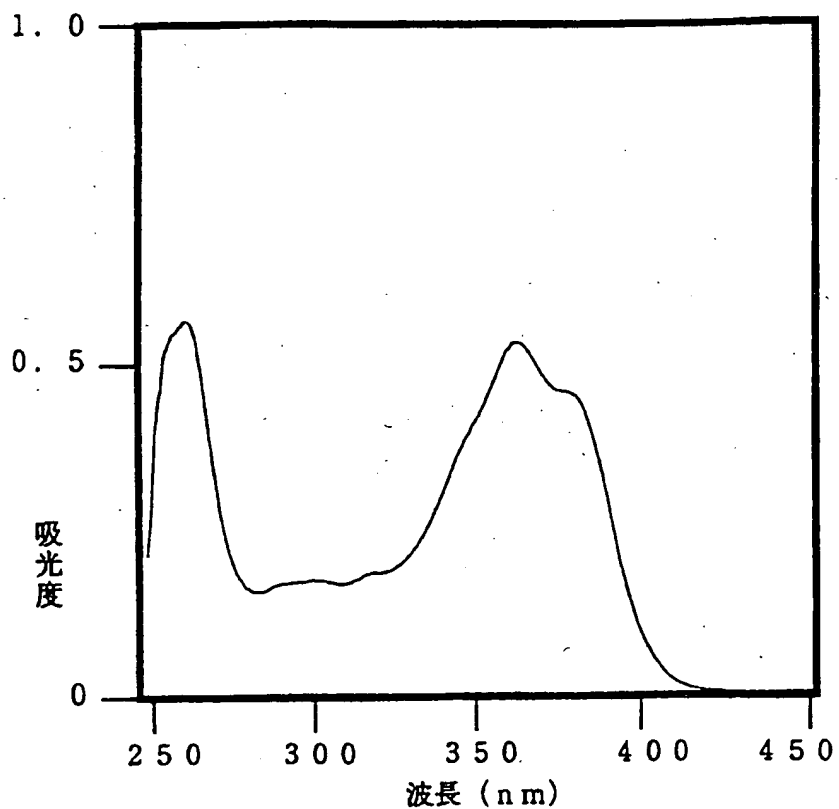
第2図



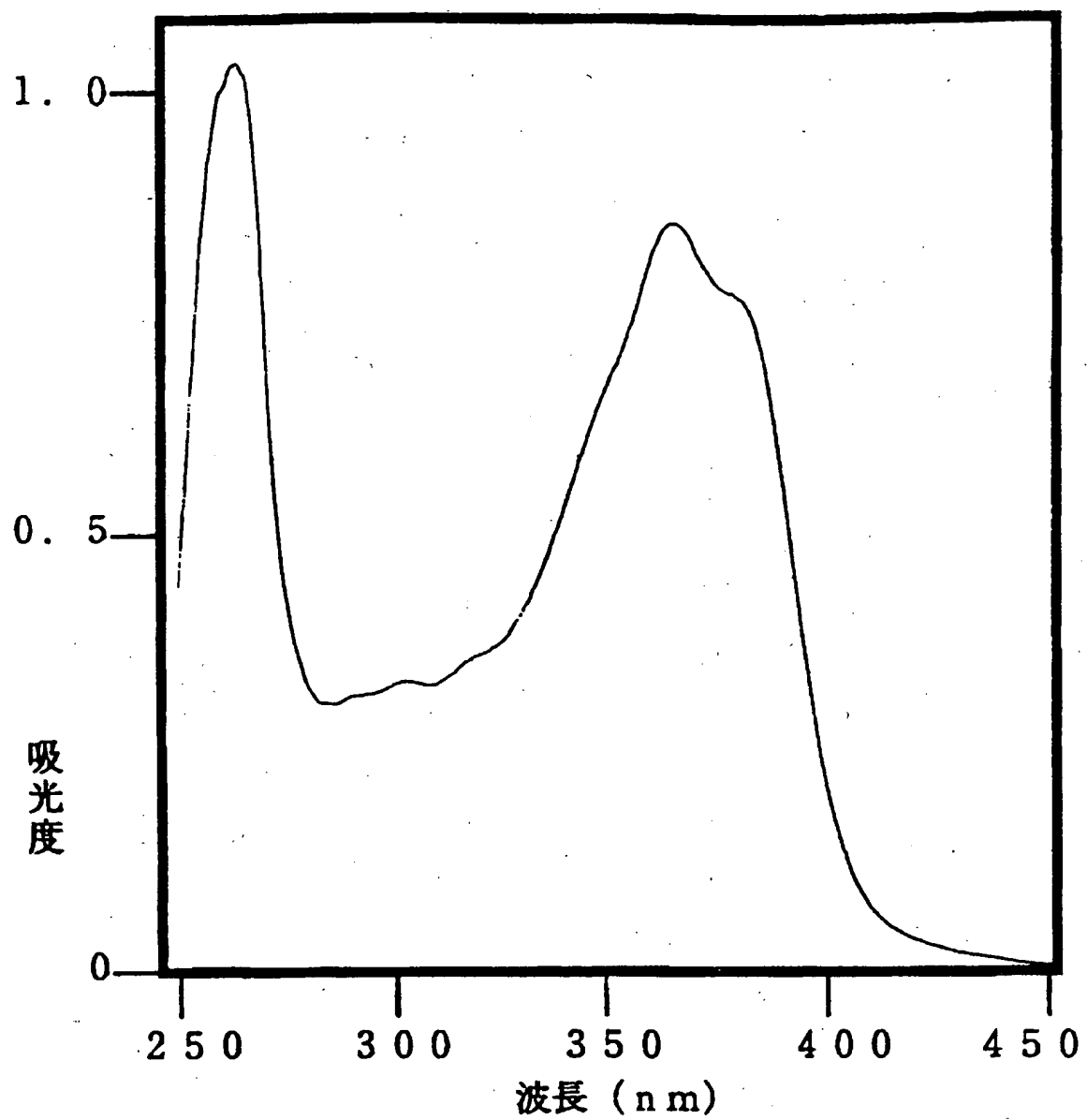
第3図



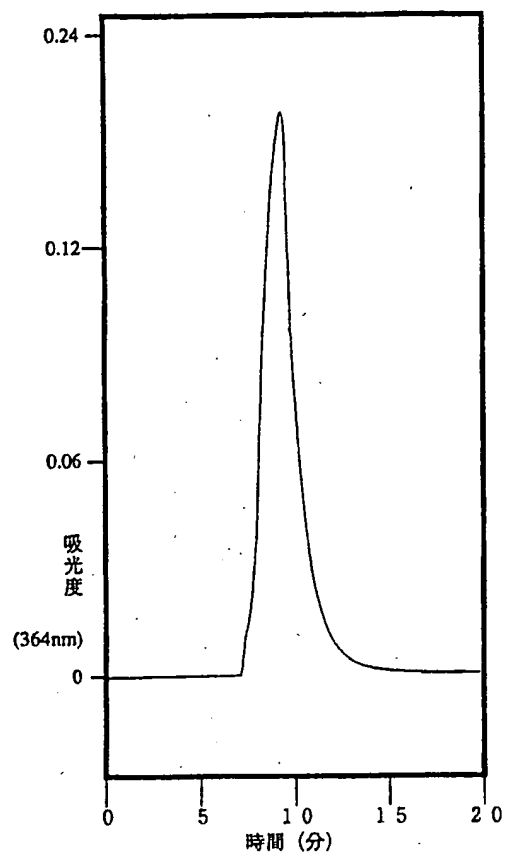
第4図



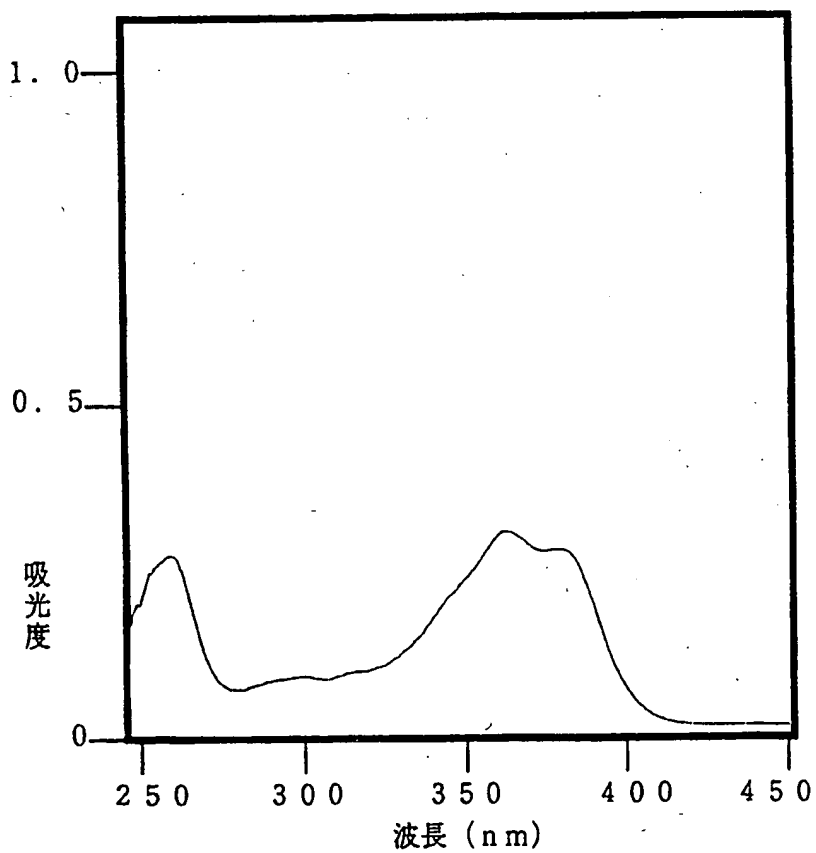
第5図



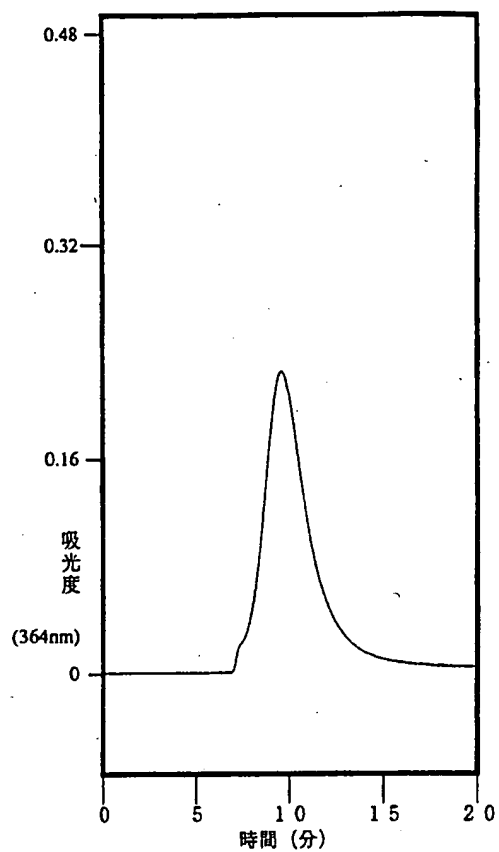
第6図



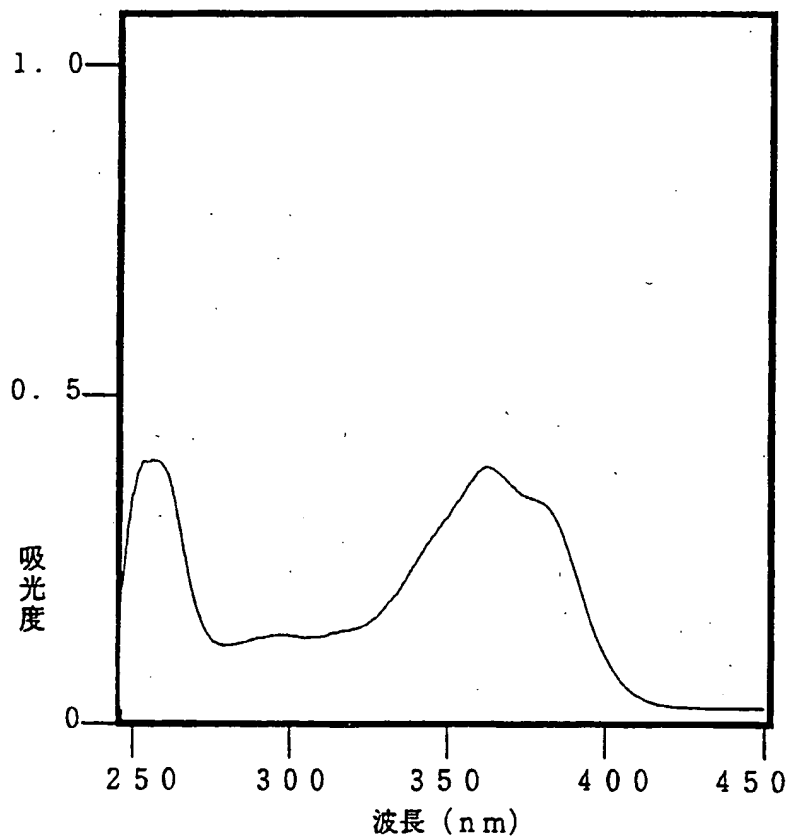
第7図



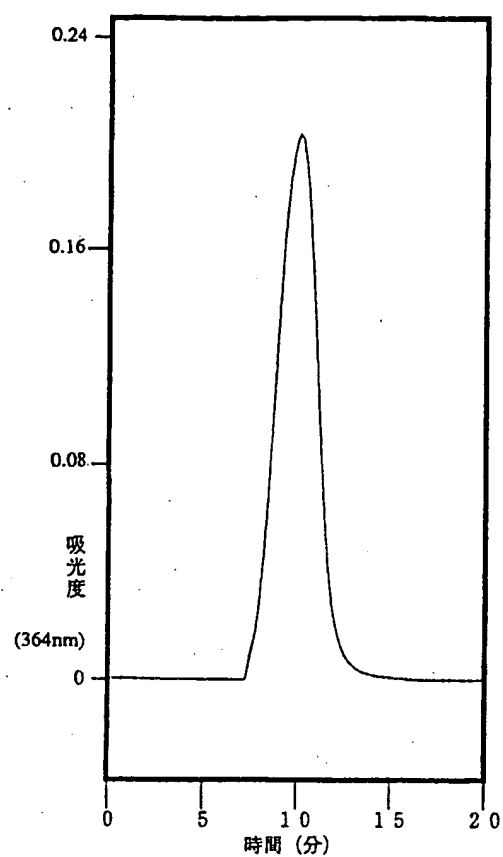
第8図



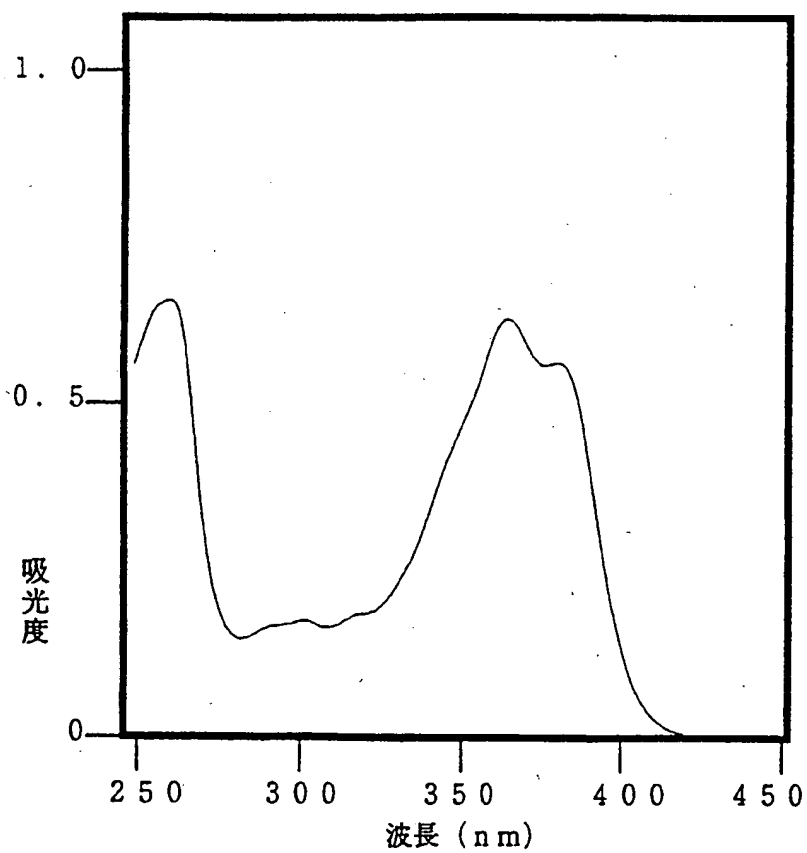
第9図



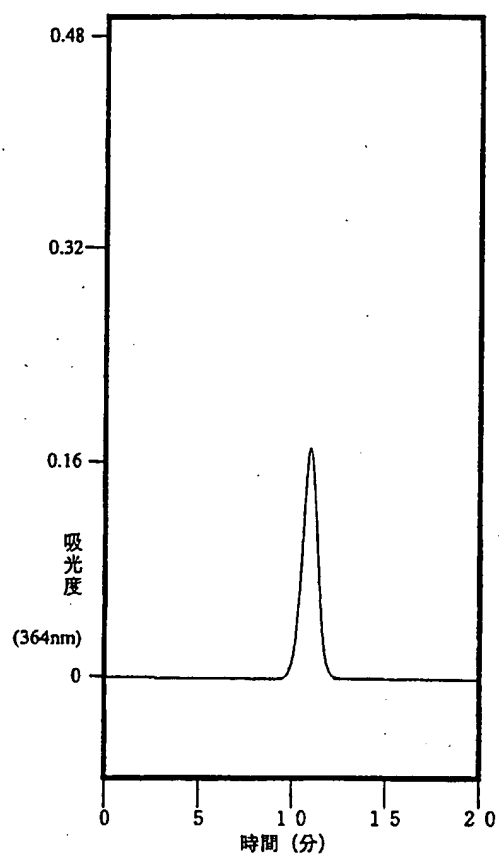
第10図



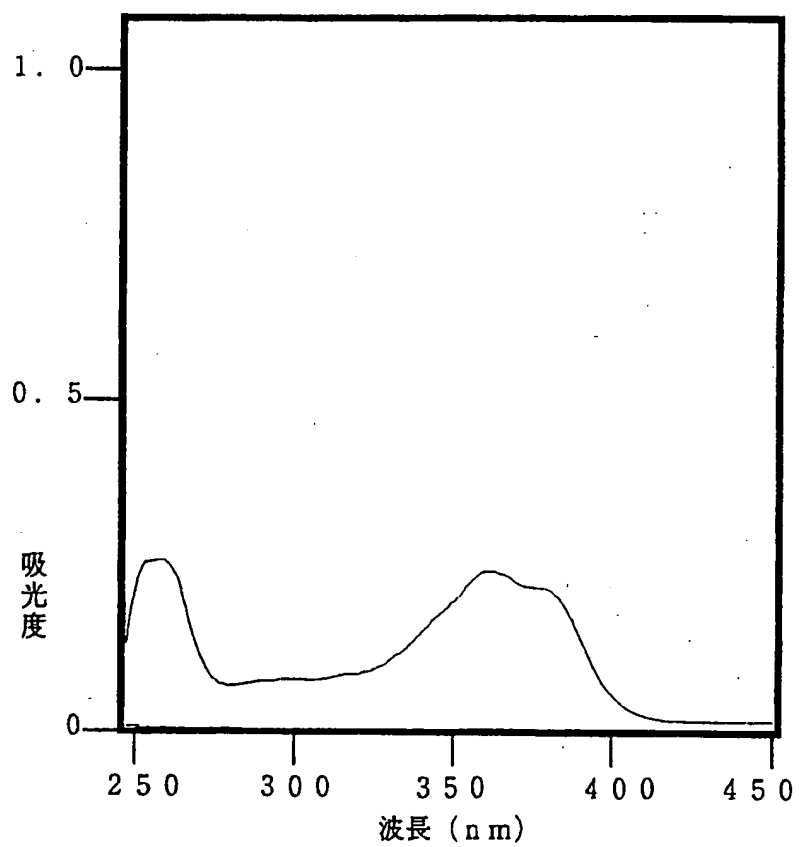
第11図



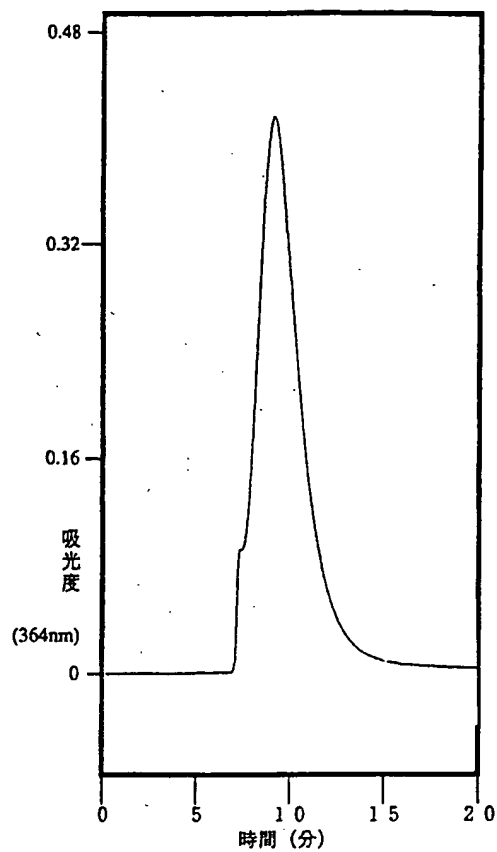
第12図



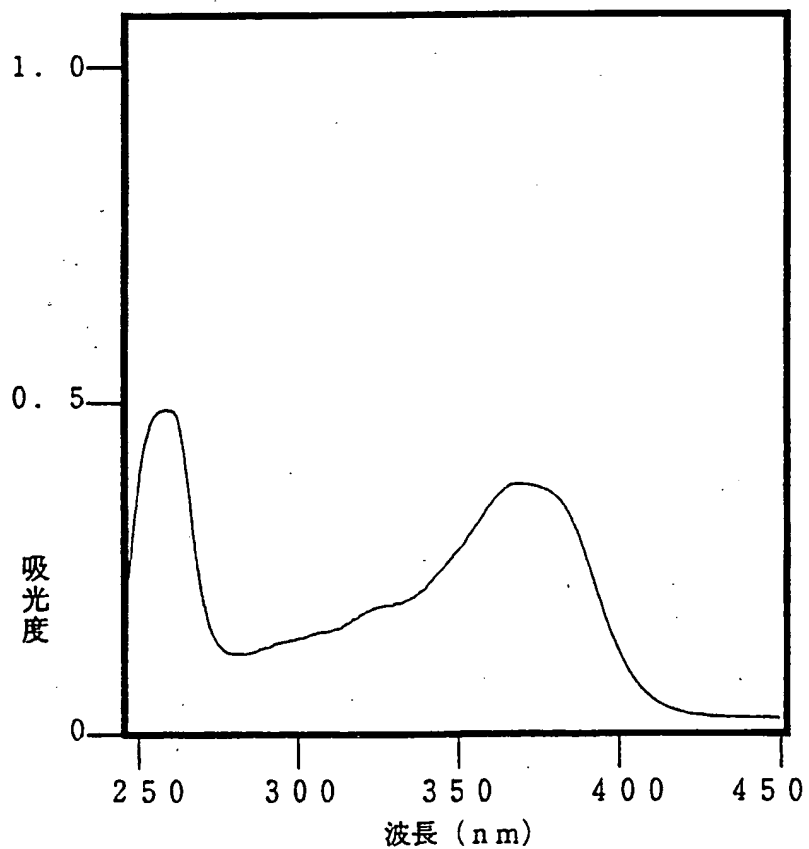
第13図



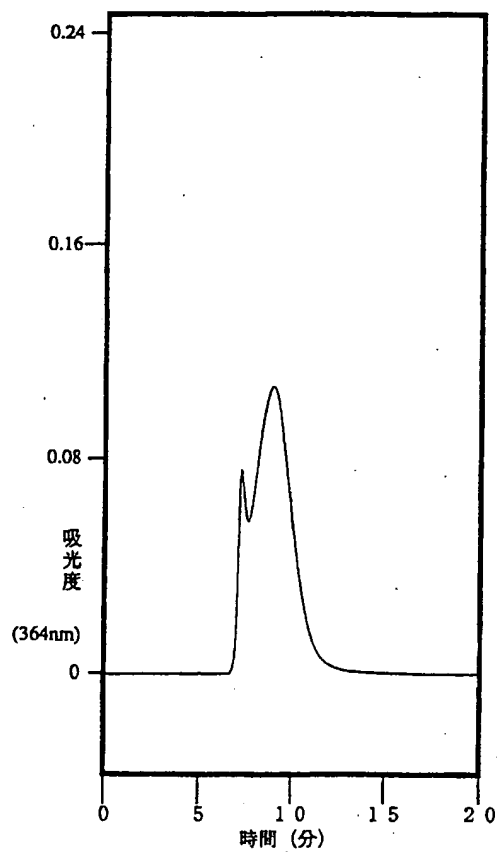
第14図



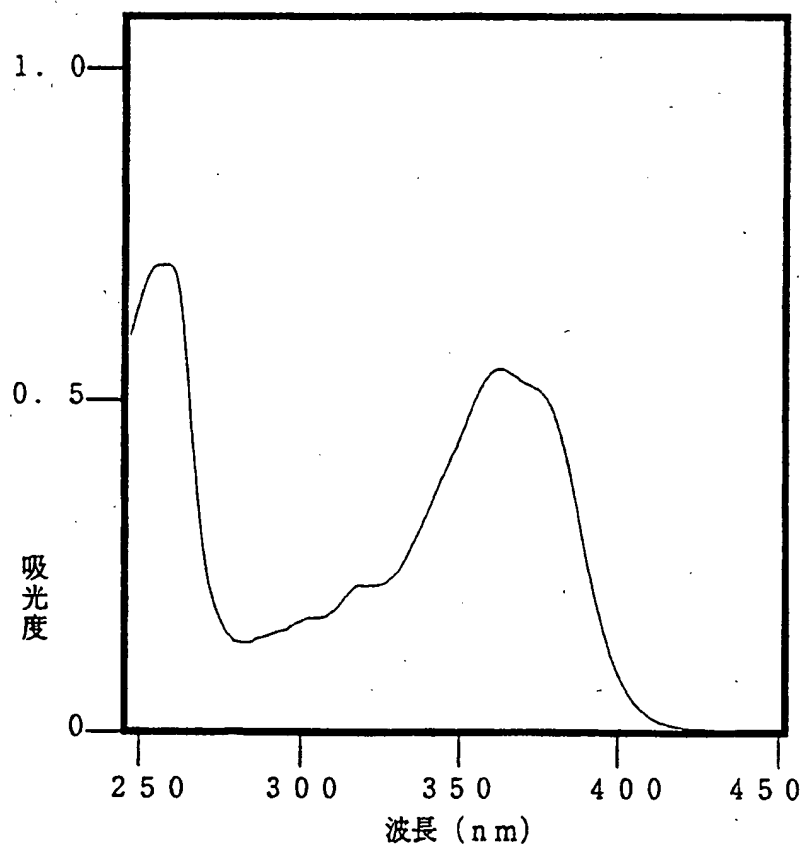
第15図



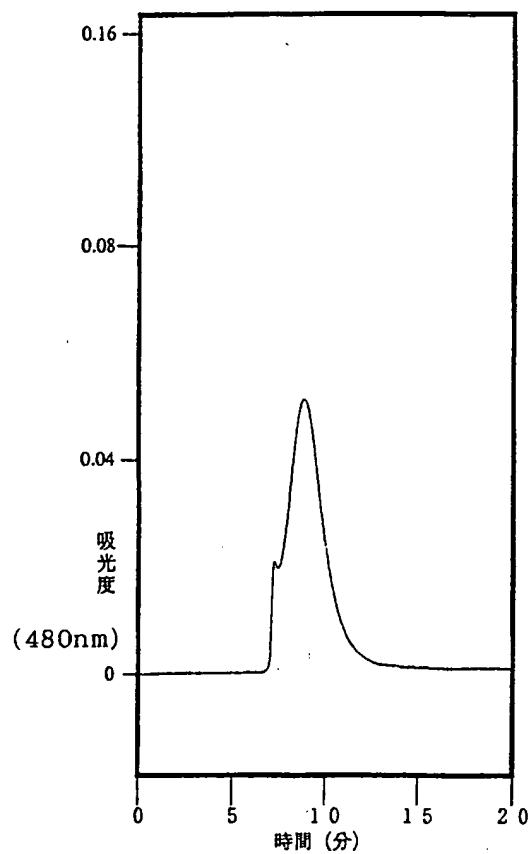
第16図



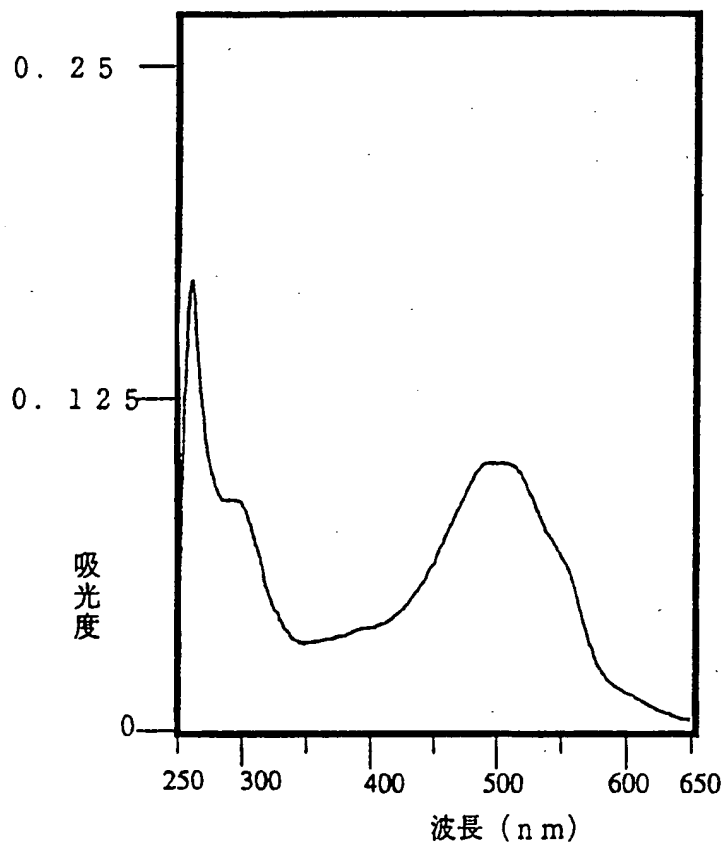
第17図



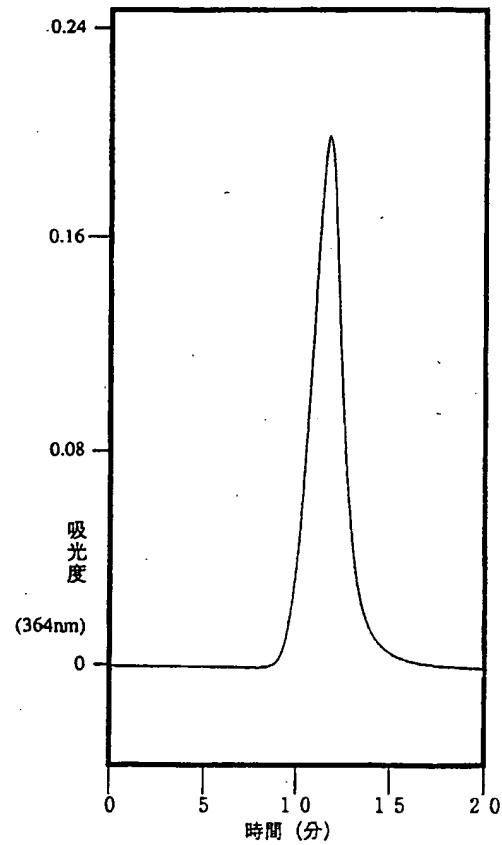
第18図



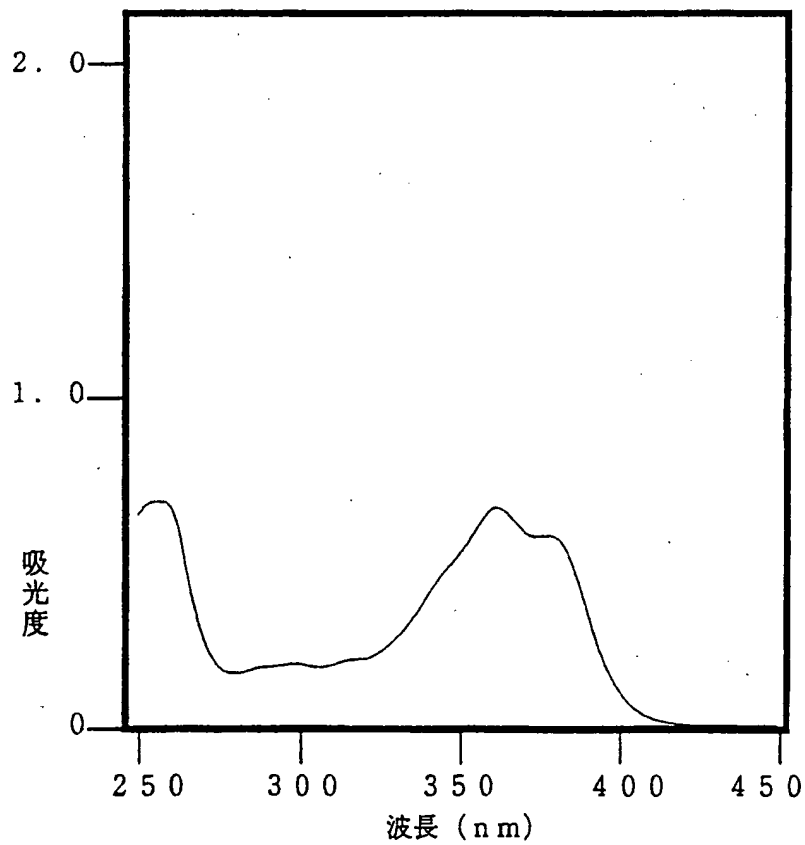
第19図



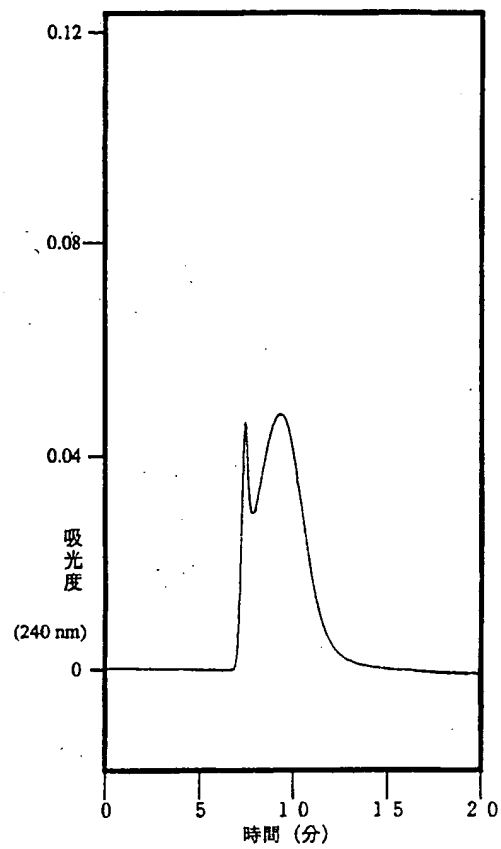
第20図



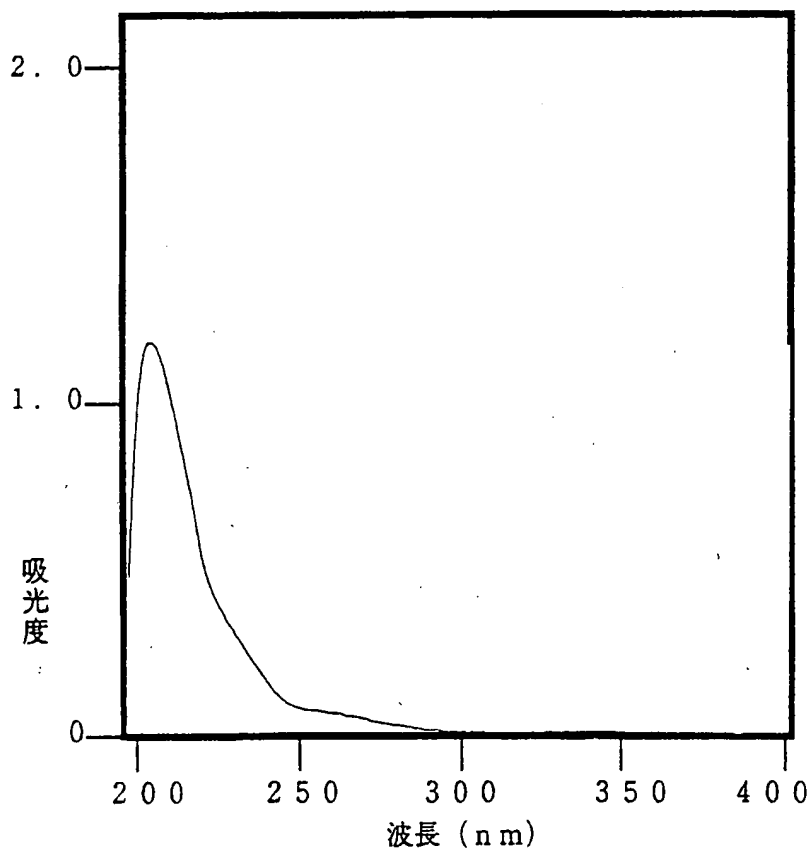
第21図



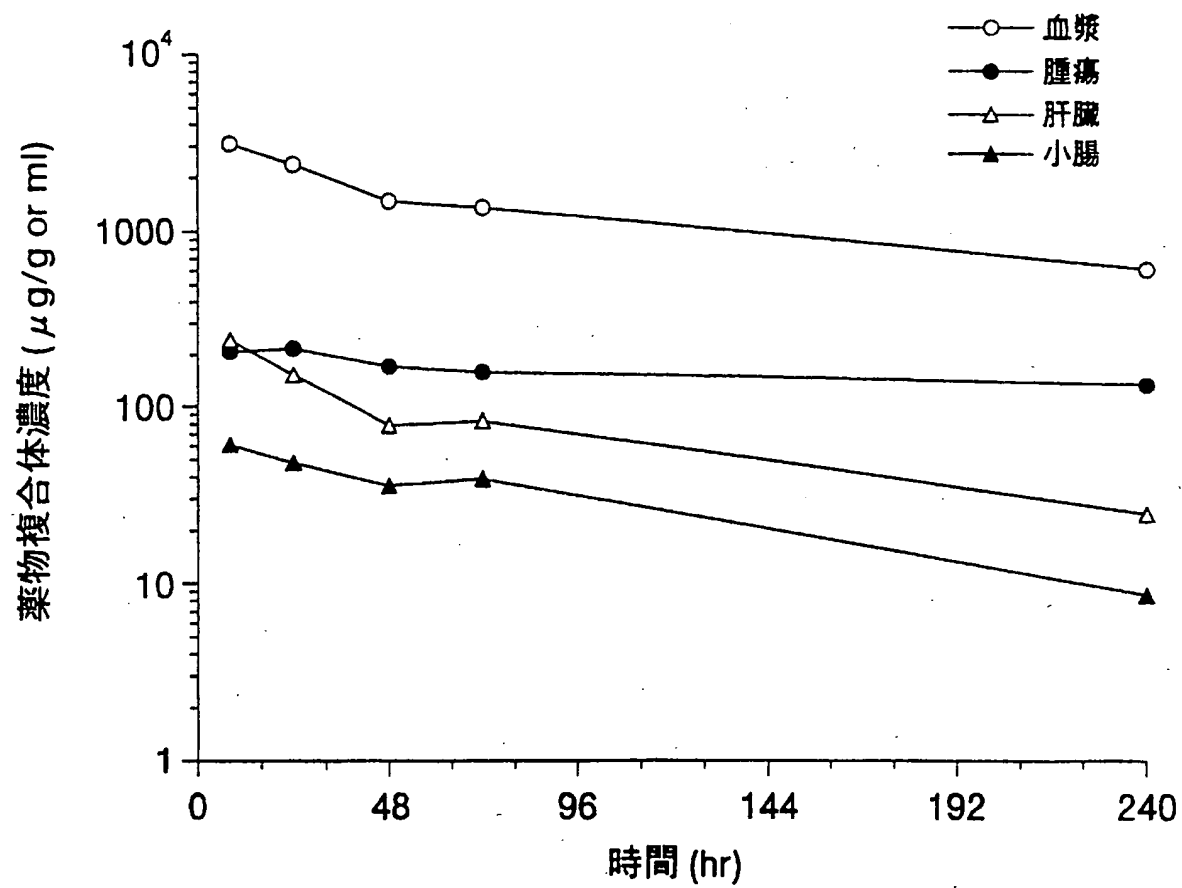
第22図



第23図



第24図



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01914

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> A61K47/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 5-39306, A (Drug Delivery System Institute, Ltd.), February 19, 1993 (19. 02. 93) (Family: none)	1 - 26
A	JP, 59-220197, A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), December 11, 1984 (11. 12. 84) (Family: none)	1 - 26

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
August 11, 1997 (11. 08. 97)Date of mailing of the international search report  
August 19, 1997 (19. 08. 97)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office  
Facsimile No.Authorized officer  
Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 97/01914

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> A61K47/48

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> A61K47/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 5-39306, A (株式会社デイ・デイ・エス研究所), 19.2月.1993 (19.02.93), (ファミリーなし)	1-26
A	J P, 59-220197, A (雪印乳業株式会社), 11.12月.1984(11.12.84) , (ファミリーなし)	1-26

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.08.97

国際調査報告の発送日

19.08.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引ム 實 員 兼 二

印

4C

7433

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

多糖-ペプチド-ドキシソルビン複合体に関する研究  
— 多糖キャリアーの血中安定性と抗腫瘍効果の関係 —

○菅原 州一、浜名 洋、矢野 敏朗、奥野 哲、  
井上 和弘

株式会社ディ・ディ・エス研究所

生分解性 (血中安定性) の異なる多糖キャリアーを用いて、多糖-ペプチド-ドキシソルビン (DXR) 複合体を構築し、キャリアーの血中安定性の抗腫瘍効果 (Walker 256 担癌ラット、*i.m.-i.v.*) に及ぼす影響について検討した。血中で分解を受ける多糖キャリアーとして、N-アセチル-CM-キトサンを、血中で安定な多糖キャリアーとしてCM-マンノグルカン、ポリアルコル化-CM-マンノグルカンを選択しペプチドスパー (Gly-Gly-Phe-Gly) を介してDXRを導入した。更に、脱N-硫酸化-N-アセチル-ヘパリンについても同様の複合体を構築した。

[<sup>3</sup>H] N-アセチル-CM-キトサンはWalker 256 担癌ラットに投与した場合、速やかに低分子化され、尿中排泄された。その複合体の抗腫瘍効果はキャリアーの分子量が大きくなるにつれ増大するものの、いずれもDXRに比べ低かった。脱N-硫酸化-N-アセチル-ヘパリンの場合も、抗腫瘍効果の低下が認められた。これは、今回用いた他の多糖キャリアーに比べ、分子量が小さく、血中滞留性が低いと考えられた。一方、CM-マンノグルカン、ポリアルコル化-CM-マンノグルカンの様な血中で安定な多糖キャリアーを用いたDXR複合体は、DXRに比べ抗腫瘍効果の増強が認められた。